

PAULO VICTOR DA SILVA QUEIROZ

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
MEMBRANAS À BASE DE CELULOSE BACTERIANA E DO
NANOCOMPÓSITO CELULOSE BACTERIANA/POLICAPROLACTONA NA
CERATOPLASTIA LAMELAR EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

Q3d
2012

Queiroz, Paulo Victor da Silva, 1985-

Desenvolvimento, caracterização e aplicação de membranas à base de celulose bacteriana e do nanocompósito celulose bacteriana/policaprolactona na ceratoplastia lamelar experimental em coelhos / Paulo Victor da Silva Queiroz. – Viçosa, MG, 2012.
xv, 66f. : il. ; (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Oftalmologia veterinária. 2. Materias biomédicos.
3. Córnea - Cirurgia. 4. Olhos - Úlceras. 5. Coelhos - Cirurgia.
6. Córnea. 7. Implantes artificiais. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

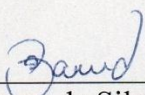
CDD 22. ed. 636.08977

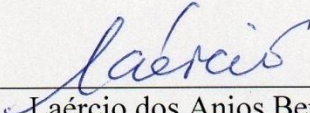
PAULO VICTOR DA SILVA QUEIROZ

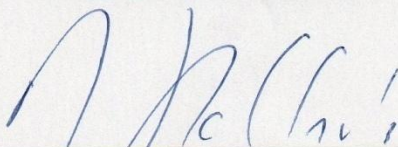
**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
MEMBRANAS À BASE DE CELULOSE BACTERIANA E DO
NANOCOMPÓSITO CELULOSE BACTERIANA/POLICAPROLACTONA
NA CERATOPLASTIA LAMELAR EXPERIMENTAL EM COELHOS**

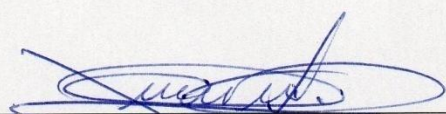
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

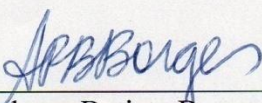
APROVADA: 04 de setembro de 2012.


Hernane da Silva Barud


Laércio dos Anjos Benjamim


Ricardo Junqueira Del Carlo
(Coorientador)


Kelly Cristine de Sousa Pontes
(Coorientadora)


Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

*“Dedico este trabalho a todos aqueles que me guiaram, que me deram forças e
esperança, que me ajudaram e que acreditaram na minha capacidade de transformação
e de realização.”*

AGRADECIMENTOS

O caminho que me trouxe até aqui não foi fácil. Existiram muitos obstáculos, mas também tive a sorte de ser muito ajudado. Por isso, nem imagino quantas páginas eu poderia escrever em agradecimento a todos que me ajudaram nessa caminhada. Assim peço desculpas àqueles que por ventura não forem citados.

Meu primeiro e mais especial agradecimento vai para a Dona Edna, minha Mãe, não só por ter me trazido para este mundo, mas por todas as provas de amor que me foram dadas.

Ao meu irmão Sandino, muito obrigado pelo exemplo de tranquilidade. Aproveito para registrar aqui a minha admiração pelo homem honrado que você se tornou.

À minha irmã Marry, por todo o apoio, carinho e cuidado que sempre teve comigo. Também pelos meus sobrinhos que tanto me divertem.

De Paulo, meu Pai, saudades...

Aos eternos amigos Daysson, Tallis, Davi, Marcão, Marcela e Suzana, serei sempre grato pelo companheirismo e incentivo.

Ao Dr. Rodrigo e ao Dr. Estevam, juntamente com suas respectivas equipes, não posso encontrar palavras que expressem a minha gratidão.

Da UNIVIÇOSA guardo boas lembranças do período em que me iniciei na Medicina Veterinária. Trago grandes amizades que jamais esquecerei: Reinado, Prof^a. Alessandra, Prof. Marcelo, Prof^a. Luciana, Sr. Silvio, Prof. André, Prof. Jair, Prof. Artur Kanadani, Prof^a Lukiya, Prof. Evandro, Prof. Rogério. Em fim, a todos, meu muito obrigado.

Aos amigos de todas as horas Vinicius, Ernane, Grelson, Vanessinha, Diego, Karin, Amanda e Mayara, pela amizade, por me ouvirem e por sempre me estenderem a mão.

Agradeço simplesmente a oportunidade de ter conhecido uma pessoa como o Prof. Romeu Sampaio. Suas lições levarei para a vida.

Referente ao mestrado, quero dedicar um agradecimento especial à Prof^a Andréa Pacheco Batista Borges, minha orientadora, pois sem ela nada teria se realizado. Mesmo sem me conhecer, aceitou me orientar, me incentivou a permanecer firme no trabalho fornecendo todo o suporte que necessitei, e me deu importantes lições profissionais e morais.

À Rosi e Bete, verdadeiros anjos de guarda, por estarem sempre prontas para nos socorrer.

Ao Prof. Lissandro, pela oportunidade e pelos ensinamentos sobre dermatologia.

Ao Prof. Ricardo Del Carlo, por ter me confiado essa oportunidade única, pelo exemplo e evidentemente pelas lições em cirurgia.

À Prof^ª. Kelly, pela coorientação e pelas valiosas instruções sobre a técnica cirúrgica.

Ao Instituto de Química da UNESP-Araraquara, por ter aberto suas portas e dado todo o apoio necessário na produção e caracterização dos biomateriais.

Ao Dr. Hernane Barud, por ter abraçado a causa, se dedicado na produção dos nossos biomateriais, e antes tudo, pelo acolhimento, amizade e incentivo.

Ao Prof. João Carlos por ter dado a sua valiosa contribuição na histologia da nossa pesquisa.

Ao Prof. Laércio por ter me instruído e participado ativamente da microscopia eletrônica de varredora.

À Emily e ao Fabrício, por demonstrarem sempre muito boa vontade em nos ajudar.

A todos do Laboratório de Biologia Estrutural, especialmente ao Prof. Sérgio da Matta, pelo acolhimento e por ter disponibilizado o corante *Picrosirius*, contribuindo assim com uma importante ferramenta para nossa pesquisa.

Ao Prof. Maurício e a todos do Laboratório de Associações Micorrízicas do BIOAGRO (UFV), pela simpatia e por terem disponibilizado o fotomicroscópio com a luz polarizada. Sem ela, a coloração com o *Picrosirius* seria inútil.

À empresa Ophthalmos, na pessoa da Sra Joana Tebet, por ter gentilmente cedido todo o medicamento necessário para a realização da pesquisa.

Aos colegas Raul, Livia, Mayara, Simone, Gustavo, Vinícius, Jonatas e Pietro, muito obrigado pela ajuda durante as cirurgias e no pós-operatório das nossas coelhinhas.

À Soninha e Divina pela amizade e pela ajuda com o instrumental cirúrgico. À Dra. Tatiana pelas lições durante a rotina cirúrgica. Ao Claudiomiro e ao Paulão pela amizade e assistência. À Cármem pelo pronto atendimento na farmácia. À Maninha pela amizade, conselhos e ajuda. Aos colegas Daniel, Vanessa, Letícia e Clara pela amizade. E a todos da equipe cirúrgica do Hospital Veterinário da UFV.

Aos amigos Sr. Sidnei, Geraldinho, Camilo, Rogerinho, Aroldo, Pádua e Diego, pelas conversas e “resenhas”.

Ao Prof. Carlos Sperber e à amiga Fabiene pela preciosa ajuda com a estatística.

Aos mestres da escola da Vida Prof. Carlos Sperber, Prof. Bento, Maria do Carmo, Sr. Caifa, Sra Didi e Mestre Alex Dong, sou grato pela amizade e pelos ensinamentos.

“Um discípulo tem de reconhecer de maneira inequívoca que a própria ideia de direitos individuais, nada mais é que a manifestação da natureza venenosa da serpente do Eu. Ele jamais deverá considerar outro homem como alguém passível de ser criticado ou condenado, nem tampouco poderá o discípulo elevar sua voz em autodefesa ou desculpa”.

Helena Blavatsky. Ocultismo Prático, p. 44.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
Apresentação	1
Introdução	1
CAPÍTULO I – A córnea e os biomateriais: aplicações e perspectivas	4
Resumo	4
Abstract	5
Introdução	5
Córnea	7
<i>Estrutura e Características biomecânicas</i>	7
<i>Lesões ulcerativas e tratamentos</i>	9
<i>Resposta tecidual à lesão</i>	10
Biomateriais	12
<i>Aplicação de biomateriais na córnea</i>	12
<i>Polímeros</i>	14
<i>Membrana de celulose bacteriana</i>	15
<i>Policaprolactona</i>	18
Considerações finais	20
Referências	20
CAPÍTULO II – Optically transparent membrane based on bacterial cellulose/polycaprolactone	29
Abstract	29
Introduction	29
Experimental Section	31
Results and Discussion	31
Conclusions	35
Acknowledgments	35

References	35
CAPÍTULO III - Estudo <i>in vivo</i> utilizando membranas de celulose bacteriana e do nanocompósito celulose bacteriana/policaprolactona como substitutos teciduais em córneas de coelhos	37
Resumo	37
Abstract	38
Introdução	39
Material e métodos	41
<i>Análise dos dados</i>	45
Resultados e discussão	46
<i>Avaliação clínica</i>	46
<i>Avaliação histológica</i>	51
<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	58
Conclusões	60
Agradecimentos	60
Referências	61
Capítulo IV – Considerações finais e perspectivas	65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – A córnea e os biomateriais: aplicações e perspectivas.

- Figura 1.1.** Corte histológico de córnea saudável de coelho. 7
- Figura 1.2.** Imagem à MEV de um corte de córnea saudável de coelho. 8
- Figura 1.3.** Fórmula estrutural da celulose com suas ligações glicosídicas β -(1→4). 16
- Figura 1.4.** Fórmula estrutural da PCL. 19

CAPÍTULO II – Optically transparent membrane based on bacterial cellulose/polycaprolactone

- Fig. 2.1.** Transparency analysis of BC and BC/PCL membranes. 32
- Fig. 2.2.** Scanning electron microscope images of BC and BC/PCL. 33
- Fig. 2.3.** X-ray diffraction analyses. 34
- Fig. 2.4.** Thermogravimetry curves. 35

CAPÍTULO III - Estudo *in vivo* utilizando membranas de celulose bacteriana e do nanocompósito celulose bacteriana/polycaprolactona como substitutos teciduais em córneas de coelhos

- Figura 3.1.** Fotografias da técnica cirúrgica para implantação das membranas do compósito celulose bacteriana/polycaprolactona (CB/PCL) e da celulose bacteriana (CB) nas córneas dos coelhos. 43
- Figura 3.2.** Média da apresentação dos sinais clínicos pós-operatórios avaliados ao longo do tempo. 49
- Figura 3.3.** Fotografias dos aspectos clínicos do pós-cirúrgico dos animais dos grupos celulose bacteriana/polycaprolactona (CB/PCL), celulose bacteriana (CB) e controle (CT). 50
- Figura 3.4.** Fotomicrografia de córneas de coelhos após três dias da implantação do compósito celulose bacteriana/polycaprolactona (CB/PCL). 52
- Figura 3.5.** Fotomicrografia de córnea de coelhos após sete dias

da implantação da membrana de celulose bacteriana (CB).	52
Figura 3.6. Fotomicrografia de córnea de coelho após 21 dias da implantação da celulose bacteriana (CB).	53
Figura 3.7. Fotomicrografias de córneas de coelhos após 45 dias da cirurgia experimental.	54
Figura 3.8. Fotomicrografia à luz polarizada da área lesionada de córneas de coelhos nos grupos celulose bacteriana/ policaprolactona (CB/PCL), celulose bacteriana (CB) e controle (CT).	57
Figura 3.9. MEV das amostras de córneas de coelhos com 45 dias da implantação nos grupos celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL), celulose bacteriana (CB) e controle (CT).	59
Figura 3.10. MEV das amostras de córneas de coelhos com 45 dias da implantação das membranas nos grupos celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL) e celulose bacteriana (CB).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Medianas das variáveis obtidas a partir de análises histológicas de córneas de coelhos, segundo a data de coleta e o tratamento.

51

RESUMO

QUEIROZ, Paulo Victor da Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2012. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de membranas à base de celulose bacteriana e do nanocompósito celulose bacteriana/policaprolactona na ceratoplastia lamelar experimental em coelhos.** Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Coorientadores: Kelly Cristine de Sousa Pontes e Ricardo Junqueira Del Carlo.

As afecções corneais representam uma das principais causas de cegueira tanto em humanos como em animais. São descritas várias técnicas cirúrgicas para recuperar a estrutura física e o estado refrativo da córnea, dentre essas, encontra-se a aplicação de diferentes tipos de biomateriais. Devido à transparência, à falta de vasos e à viscoelasticidade que a córnea apresenta, os biomateriais para nela serem aplicados devem passar por criteriosa seleção. A celulose bacteriana (CB) e a policaprolactona (PCL) são dois consagrados biomateriais, bastante estudados isoladamente. Foi proposto, neste estudo, a produção e a caracterização de membranas à base de CB e de PCL para serem testadas como substituto tecidual em córneas de coelhos. Membranas de CB foram produzidas por meio do cultivo estático da bactéria *Gluconacetobacter xylinus*. Após serem lavadas e secas, as membranas foram intumescidas em acetona por 48 horas e então imersas em 25 ml de solução a 3% de PCL diluída em acetona durante 72 horas. Na sequência, as membranas do compósito CB/PCL passaram por repetidas lavagens em acetona, e foram secas para serem caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio-X, ensaios térmico e mecânico e transmissão óptica. Foi realizado o estudo *in vivo* com membranas do compósito CB/PCL e da CB pura para avaliar suas interações com o tecido corneal. Inicialmente elas foram cortadas em 8 mm de diâmetro para então serem implantadas nas córneas dos animais. Foram utilizadas 36 coelhas divididas em três grupos de 12 animais. Foi criada uma úlcera de 5 mm de diâmetro e 0,2 mm de profundidade na córnea direita de todos os animais. A partir da base da úlcera o estroma foi separado, criando-se um bolso interlamelar, sendo que um grupo recebeu membranas do compósito CB/PCL e outro grupo recebeu membranas da CB, que foram ajustadas dentro do bolso. O último grupo não recebeu tratamento sendo utilizado como controle. Os animais foram acompanhados por até 45 dias, sendo feitas avaliações clínicas para os sinais de dor e inflamação. Três animais de cada grupo foram eutanasiados aos três, sete, 21 e 45 dias após a cirurgia, para coleta de amostras para análises histológicas (HE e *Picrosirius*) e

MEV. O compósito CB/PCL apresentou 84% de transmissão de luz, enquanto que a CB pura apresentou 65%. Houve redução da resistência à tração e do módulo de Young do compósito CB/PCL em relação à CB pura. Em contrapartida, o compósito apresentou aumento na ruptura ao alongamento, demonstrando incremento na elasticidade do material. Os olhos que receberam implantes apresentaram inflamação moderada até os 30 dias de pós-operatório, reduzindo progressivamente até os 45 dias da cirurgia. A análise histológica demonstrou, aos 21 e aos 45 dias, presença de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário em intensidade moderada e células gigantes nos animais implantados, sugerindo resposta inflamatória persistente e do tipo corpo estranho. Também foi observada fibroplasia em torno das membranas, sendo este um sinal positivo de biocompatibilidade. A epitelização foi completa somente no grupo controle, demonstrando que as superfícies das membranas não permitiram o crescimento e manutenção do epitélio. Pela coloração de *Picrosirius*, evidenciou-se maior proporção do colágeno tipo III ao final dos 45 dias nos grupos com implantes, sugerindo que o processo de reparação em torno das membranas estava incompleto. A MEV demonstrou matriz extracelular e células aderidas às superfícies dos implantes, sinalizando integração no período de 45 dias. As membranas tanto do compósito CB/PCL como da CB incitaram resposta inflamatória crônica e de corpo estranho, e não permitiram a completa epitelização sobre suas superfícies. Baseado nisso, acredita-se que os implantes CB/PCL e CB, da maneira como foram desenvolvidos, não devem ser indicados para substituir o tecido corneal de coelhos.

ABSTRACT

QUEIROZ, Paulo Victor da Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September of 2012. **Development, characterization and application of membranes made of bacterial cellulose and of the nanocomposite bacterial cellulose/polycaprolactone on experimental lamellar keratoplasty in rabbits.** Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-advisers: Kelly Cristine de Sousa Pontes and Ricardo Junqueira Del Carlo.

Corneal conditions are among the main causes of blindness in both humans and animals. Many surgical techniques are described to recover the cornea's physical structure and refractive state; among them is the use of different types of biomaterials. Due to the cornea's transparency, viscoelasticity and lack of vessels, biomaterials to be applied on them must undergo a careful selection. Bacterial cellulose (BC) and polycaprolactone (PCL) are two well known biomaterials, studied extensively in separate. The purpose of the present study was to produce and characterize membranes made of BC and PCL to be tested as corneal tissue substitutes in rabbit's cornea. Membranes of BC were produced through static culture of the bacteria *Gluconacetobacter xylinus*. Membranes were then washed, dried and swelled in acetone for 48 hours, followed by immersion in 25ml of 3% PCL solution for 72 hours. Next, membranes of the BC/PCL composite underwent several washes in acetone and were then dried to be characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction, thermal and mechanical trials and luminous transmittance. In vivo study was conducted with the BC/PCL composite and with pure BC to evaluate their interactions with corneal tissue. At first, membranes were cut in 8mm diameter to be then applied in corneal tissue. Thirty six female rabbits were separated in three groups of 12 animals each. An ulcer of 5mm in diameter and 0.2mm in depth was created on the right cornea of all rabbits. From the base of the ulcer, the stroma was separated creating an interlamellar pocket, and each group of 12 animals received 8mm diameter BC/PCL composite membrane and the other group received BC membranes on the same size, both adjusted in the pocket. The last group did not receive any membrane, used as the control. Animals were followed for 45 days, where clinical evaluations for signs of pain and inflammation were conducted. Three animals of each group were euthanized on days 3, 7, 21 and 45 after surgery to collect samples for histology (HE and *Picrosirius*) and SEM. BC/PCL presented 84% of light transmission while pure BC presented 45%. Lower tension resistance and Young's module was observed on the composite

compared to pure BC, while the composite presented greater elongation at rupture what demonstrates a greater viscoelasticity of this material. Eyes that received membranes presented moderate inflammation until 30 days after surgery, decreasing progressively until 45 days. Histology revealed the presence of lymphohistiocytic inflammatory infiltrate at 21 and 45 days in implanted groups, at a moderate intensity, as well as giant cells, suggesting chronic inflammatory and foreign body reactions. Fibroplasia was observed around the membranes, a positive sign of biocompatibility. Epithelization was complete only in control group, what shows that membranes' surfaces did not allow epithelium growth and maintenance. *Picrosirius* staining showed a greater proportion of type III collagen at the end of 45 days in both implanted groups, suggesting that the repair process around the membranes was incomplete. SEM showed extracellular matrix and cells adhered to implant surfaces, suggesting integration at 45 days. Both membranes made of BC/PCL composite and BC alone stimulated chronic inflammatory and foreign body reactions and did not allow complete epithelization on their surfaces. Based on these conclusions, we believe that implants made of BC/PCL and BC using the here presented process are not indicated as a substitute for corneal tissue in rabbits.

INTRODUÇÃO GERAL

Apresentação

Esta dissertação trata do tema biomateriais como substitutos do tecido corneal. Prática médica que é aplicada mais comumente em humanos; porém, todas as novas técnicas e novos biomateriais são antes testados em animais, área de competência da Medicina Veterinária.

Para melhor entendimento e melhor divisão dos assuntos, o trabalho foi separado por capítulos. O capítulo I faz alusão à estrutura e fisiologia da córnea, aos pré-requisitos de um biomaterial para nela ser implantado, aos tipos de biomateriais já utilizados e ao potencial da celulose bacteriana (CB) e da policaprolactona (PCL) para serem utilizados como substituto do tecido na corneal. Esse capítulo foi escrito seguindo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), adaptada de acordo com as normas estabelecidas pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa (PPG/UFV).

O capítulo II trata da produção e caracterização de um novo biocompósito, baseado na CB e na PCL (compósito CB/PCL), que teve como objetivo melhorar as propriedades da CB para torná-la mais apta a ser implantada na córnea. Este capítulo foi escrito em forma de artigo, de acordo com as normas da revista *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, onde já se encontra aceito para a publicação.

O capítulo III apresenta todo o trabalho de pesquisa resultante da implantação de membranas da CB e do compósito CB/PCL como substitutos teciduais em córneas de coelhos. Este capítulo foi redigido de acordo com as mesmas normas descritas para o capítulo I.

Introdução

Mais de 10 milhões de pessoas no mundo sofrem de perda da visão devido à doenças ou lesões na córnea. O tratamento de maior sucesso para esses casos é o transplante com tecido corneal doador, que só é procedido quando se trata de um quadro de cegueira corneal irreversível (WHITCHER *et al.*, 2001). No entanto, a fonte de tecido doador pode ser limitada devido ao aumento das cirurgias refrativas, ao envelhecimento da população e a falta de sistemas eficientes de captação e de bancos de conservação das córneas. Além disso, a taxa de sucesso da enxertia pode ser baixa quando se trata de afecções como queimaduras químicas, síndrome de Stevens–Johnson ou penfigóide cicatricial ocular (SUTPHIN, 1999; ZERBE *et al.*, 2006); contudo há

uma grande demanda para alternativas que substituam o tecido corneal doador. Nesse contexto, a engenharia de tecidos é uma área que vem crescendo nos últimos anos e se aperfeiçoando no reparo e substituição de tecidos danificados (YANG *et al.*, 2001; MYUNG *et al.*, 2008).

Os substitutos corneais, mais conhecidos como ceratopróteses, são projetados para restaurar um nível funcional de visão em vez de regenerar a córnea. A maior parte desses dispositivos é feita a partir de polímeros plásticos, concebidos para ter um centro óptico (transparente) rodeado por uma borda que proporciona ancoragem com o tecido hospedeiro. Diversos materiais vêm sendo empregados na produção de bordas das ceratopróteses, buscando-se estabilidade adequada e resistência a fim de permitir a colocação de sutura. No entanto, o mais importante é que esses materiais não devem ser imunogênicos e nem mutagênicos para permitir a aceitação pelo hospedeiro (GRIFFITH *et al.*, 2009).

A córnea pode ser classificada como um hidrogel transparente, que compreende principalmente colágeno, proteoglicanos e células. A sua clareza óptica pode ser atribuída à falta de vasos e à presença de estruturas menores que o espectro de luz visível (GRIFFITH *et al.*, 2009). Por isso, alguns dispositivos para substituir o tecido corneal envolvem componentes da matriz extracelular, como os colágenos tipo I e IV, buscando-se maior semelhança com o tecido natural e melhor integração da ceratoprótese ao hospedeiro (BENTLEY *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2011). Porém, o conjunto deve ser sustentado por um biomaterial não degradável, que na maioria dos casos são polímeros, pois neste grupo, as características como a resistência mecânica, a elasticidade, a possibilidade de modificação da superfície, o peso molecular, a possibilidade de moldagem e a biocompatibilidade, podem variar muito entre os diferentes tipos. Por isso, podem-se selecionar aqueles que melhor se assemelham com a estrutura corneal (WILKS, 2000; MANO *et al.*, 2004; MYUNG *et al.*, 2008).

Novos polímeros, como a celulose bacteriana (CB) e a policaprolactona (PCL) vêm sendo estudados em diversas áreas. A CB é uma membrana formada por microfibras de celulose, conhecida por ser flexível, biocompatível, semitransparente, hidrofílica e bastante resistente. É também um material proveniente de fontes renováveis e com baixo custo de produção (CZAJA *et al.*, 2007; KLEMM, *et al.*, 2005; BARUD, 2010). Já a PCL é um polímero termoplástico, de peso molecular variável, biorreabsorvível, com boas características mecânicas. Apresenta compatibilidade com várias outros biomateriais, o que faz dela um material bastante usado em compósitos

(ELZEIN *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2006). Até então, não se encontram relatos da utilização desses dois biomateriais como substitutos do tecido corneal.

As pesquisas atuais trabalham em a favor do desenvolvimento de dispositivos que forneçam um bom nível de refração, e que tenham longa duração após implantados na córnea (LLOYD *et al.*, 2001). Neste trabalho foi feito um estudo sistemático das propriedades corneais que são importantes para a escolha do substituto tecidual mais adequado, com também dos biomateriais já utilizados para essa função, para então, produzir e caracterizar membranas com base na celulose bacteriana e na policaprolactona, e testar os seus desempenhos como substituto do tecido corneal em coelhos.

CAPITULO I

A córnea e os biomateriais: aplicações e perspectivas

Resumo

As afecções corneais são importantes causas de cegueira, tanto em humanos quanto em animais. Vários tratamentos para recuperar a integridade e o estado refrativo da córnea estão descritos, e dentre eles, destaca-se a aplicação de biomateriais como substituto tecidual. O objetivo desse estudo foi descrever a estrutura e a fisiologia da córnea, assim como os biomateriais nela aplicados, além das propriedades e aplicações biomédicas da celulose bacteriana (CB) e da policaprolactona (PCL). Diversos tipos de biomateriais já foram pesquisados em aplicações na córnea, podendo-se destacar os polímeros, que devido as suas propriedades físico-químicas têm mostrado bom desempenho como substitutos do tecido corneal. Nesse contexto, a CB, que se trata de uma membrana polimérica, resistente e biocompatível, pode representar mais uma opção para se fabricar dispositivos aptos a serem aplicados na córnea. Porém, a CB tem a elasticidade e transparência limitadas, por isso é preciso melhorar essas características adicionando outros materiais à membrana, tornando-a mais adequada para a utilização na córnea. A PCL é um polímero biocompatível, que apresenta viscoelasticidade e pode ter seu peso molecular ajustado. Assim, acredita-se que a adição da PCL às membranas de CB pode resultar em um compósito com melhores condições para servir de substituto do tecido corneal.

Palavras chave: úlcera de córnea, substituto tecidual, Celulose Bacteriana, Policaprolactona, Biomateriais.

Cornea and biomaterials: applications and perspectives

Abstract

Corneal disorders are an important cause of blindness both in humans and animals. Many treatments to recover the integrity and refractive state of the cornea have been described. Among them, the application of biomaterials as tissue substitutes can be found. The aim of this chapter is to describe the structure and physiology of the cornea as well as the biomaterials used on it, and also the properties and biomedical applications of the bacterial cellulose (BC) and polycaprolactone (PCL). Many biomaterials have been studied for use on the cornea. Due to a great variety of physical and chemical properties, polymers have shown good results as substitutes of corneal tissue. In this context, BC, a biocompatible and resistant polymer that is used as membranes, may represent an option to fabricate devices for the use on the cornea. However, BC has limited elasticity and transparency, reasons to improve these characteristics by the addition of other materials to BC membranes. PCL is a biocompatible polymer presenting viscoelasticity and can have its molecular weight adjusted as needed. Therefore, the addition of PCL to BC membranes may result on a composite with better characteristics for application on the cornea.

Keywords: corneal ulcer, tissue substitute, Bacterial Cellulose, Polycaprolactone, biomaterials.

Introdução

As afecções corneais constituem a segunda causa mais importante de diminuição da visão ou cegueira entre os humanos (WHITCHER *et al.*, 2001). Nos animais domésticos, as doenças da córnea também são importantes causas de cegueira (SLATTER, 2005). Em algumas ocasiões, a intervenção cirúrgica é necessária para recuperar o estado refrativo dos olhos que sofreram injúrias corneais (LLOYD *et al.*, 2001).

Nesse contexto, técnicas cirúrgicas de ceratoplastia utilizando-se materiais de origem biológica estão descritas (LAUS *et al.*, 2000; BRAGA *et al.*, 2004; DAMASCENO *et al.*, 2004; PONTES *et al.*, 2012). Mas os enxertos biológicos podem não estar facilmente disponíveis, ou não obterem sucesso diante de algumas enfermidades (FENGLAN *et al.*, 2007; BENTLEY *et al.*, 2010). Para sanar esse

problema, a engenharia de tecidos busca materiais sintéticos que possam constituir dispositivos que substituam temporariamente o tecido, até que ele se regenere, ou que funcionem como implantes permanentes, substituindo o tecido (COSTA *et al.*, 2006; SHEARDOWN e GRIFFITH, 2008; BENTLEY *et al.*, 2010; EVANS *et al.*, 2011; HARTMANN *et al.*, 2011).

Para desempenhar sua função refrativa e ao mesmo tempo protetora no sistema oftálmico, a córnea é dependente de uma série de particularidades fisiológicas, estruturais e mecânicas (QAZI *et al.*, 2010; RUBERTI *et al.*, 2011). Devido a essas particularidades, principalmente fisiológicas, a aceitação de implantes pela córnea é limitada, muitas vezes culminando com a expulsão do biomaterial ou com o excesso de invasão vascular e consequente, cicatrização exagerada (LLOYD *et al.*, 2001; SHEARDOWN e GRIFFITH, 2008).

Atualmente, pesquisadores buscam um dispositivo que possa substituir a córnea definitivamente, constituindo a ceratoprótese ideal. Para tanto, ela deve ser composta por um material não biodegradável, podendo ser complementada por outros biodegradáveis que facilitem o crescimento de epitélio e de matriz estromal (TANURE, 2006; BENTLEY *et al.*, 2010).

Por possuírem características físico-químicas favoráveis para aplicação na córnea, os biopolímeros são muito utilizados na engenharia de tecido corneal, existindo assim, grande número de pesquisas que testaram bases poliméricas como matriz para cultivo de células e como implantes temporários ou permanentes (FENGLAN *et al.*, 2007; SHEARDOWN e GRIFFITH, 2008; BENTLEY *et al.*, 2010, FANG *et al.*, 2011).

O dispositivo a ser implantado na córnea deve possuir, na sua borda, um biomaterial que permita boa integração com o tecido, e no centro, ele deve ter propriedades ópticas que permitam a transmissão e o direcionamento de luz para a retina. O ideal seria se as duas características fossem encontradas em um só biomaterial (TANURE, 2006).

Pensando-se em desenvolver membranas poliméricas, buscando-se a melhoria das características ópticas da celulose bacteriana (CB) e da policaprolactona (PCL), para então testar o desempenho dessas membranas em ceratoplastias *in vivo*, o objetivo desse estudo foi descrever a estrutura e a fisiologia corneal, assim como as propriedades físico-químicas da CB e da PCL e suas aplicações biomédicas.

Córnea

Estrutura e Características biomecânicas

A córnea é um tecido altamente especializado na transmissão e refração da luz para o interior do olho. Por isso deve permanecer sempre translúcida, particularidade que se deve à ausência de vasos no tecido, ao epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado, à organização uniforme das fibras colágenas e ao controle hídrico tecidual (ELLENBERG *et al.*, 2010).

Em coelhos a córnea possui espessura central de 0,36 a 0,40 mm (SCHULZ, *et al.*, 2003). Histologicamente, ela é formada por quatro camadas que são o epitélio, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (FIGURA 1.1). Córneas de humanos, primatas e aves possuem uma quinta camada, a membrana limitante anterior ou membrana de Bowman, localizada entre o epitélio e o estroma (DYCE *et al.*, 2004, SLATTER, 2005).

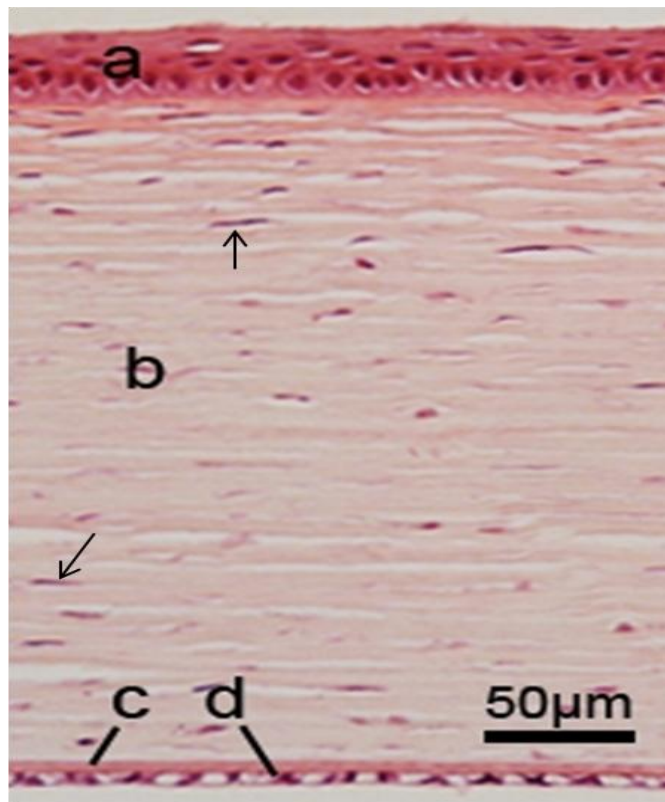


Figura 1.1. Corte histológico de córnea saudável de coelho. a: epitélio, b: estroma, c: membrana de Descemet, d: endotélio, seta preta: ceratócito (coloração HE – UFV, 2012).

Cada camada parece ter suas próprias características mecânicas. A resistência do epitélio é conferida pelas junções intercelulares e complexos de adesão, que tem pouca elasticidade, as quais podem romper causando lesões epiteliais quando há edema ou aumento da pressão intraocular (SLATTER, 2005; MUCCIOLI *et al.*, 2006). O

estroma, porção que confere resistência mecânica à córnea, corresponde a cerca de 90% da sua espessura. Ele é constituído por resistentes fibras de colágeno com predominância dos colágenos tipo I e V. Entre as fibras de colágeno encontram-se os ceratócitos (Figura 1.1), células que são envolvidas pela matriz extracelular formada por água, proteoglicanos, glicoproteínas e sais inorgânicos (QAZI *et al.*, 2010). A membrana de Descemet é bastante elástica, constituída por colágeno tipo IV, que confere certa resistência ao frágil endotélio, formado por apenas uma camada de células (MUCCIOLI *et al.*, 2006; QAZI *et al.*, 2010).

A córnea possui características viscoelásticas complexas (GLASS *et al.*, 2008). Quando submetida à força de compressão ou estiramento, a córnea reorganiza suas lâminas e incrementa sua elasticidade até chegar a um novo estado de equilíbrio (TORRES *et al.*, 2005). As lâminas colágenas no estroma anterior são dispostas obliquamente à superfície corneal e se entrecruzam de forma mais densa do que no tecido estromal posterior, onde as lâminas são dispostas paralelas à superfície (Figura 1.2). Além disso, o estroma posterior apresenta maior quantidade do proteoglicano sulfato de queratan, os quais são mais hidrofílicos, enquanto o estroma anterior possui maior concentração do proteoglicano sulfato de dermatan, que é menos hidrofílico. Por essas diferenças estruturais, acredita-se que o estroma anterior é quem determina a estabilidade e a curvatura da córnea, e apresenta maior resistência ao edema (MULLER *et al.*, 2001).

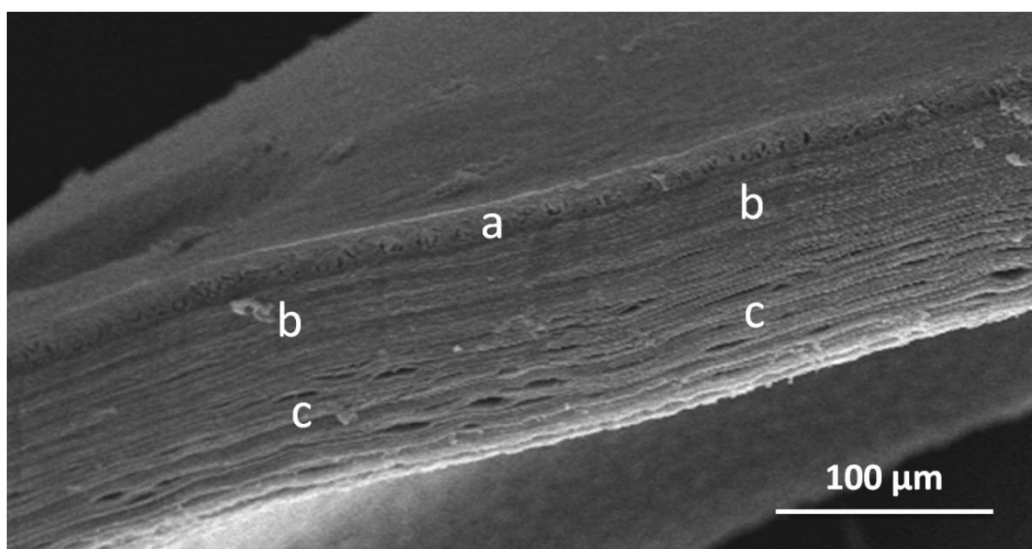


Figura 1.2. Imagem à MEV de um corte de córnea saudável de coelho. **a:** camada epitelial. **b:** organização mais densa das lâminas de colágeno no estroma anterior. **c:** organização mais espaçada das lâminas de colágeno no estroma posterior (UFV, 2012).

HOELTZEL *et al.* (1992) estudaram as córneas de bovinos, de coelhos e de humanos por meio do ensaio de tração para comparar as suas respectivas resistência à tração, tensão-deformação e histerese. Após três ciclos de aplicação de força em cada amostra, seguido pelos cálculos apropriados do ajuste da tensão-relaxamento para as diferentes espécies, os valores da tensão-deformação se mostraram semelhantes, de acordo com as relações de forças exponenciais típicas do tecido colágeno. Contudo, o valor da tensão que cada córnea suportou até a máxima deformação variou entre as diferentes espécies (humano 0,58 MPa, coelho 0,80 MPa e bovino 0,35 MPa – Unidades transformadas de N/cm²). Houve variação também na tensão-relaxamento, a qual se mostrou mais elevada nas córneas de bovinos e de coelhos, sendo que o valor apresentado pelas córneas dos coelhos foi duas vezes maior em relação à dos bovinos, o que faz sentido devido à maior tensão sofrida. Concluíram assim, que as córneas de coelhos apresentam o maior valor de histerese entre as três espécies.

Zeng *et al.* (2001) compararam a biomecânica de córneas de suínos com as córneas de humanos. Eles constataram que ambas apresentam resistência à tração e tensão-deformação semelhantes. Porém há uma diferença significativa no valor da tensão-relaxamento. Assim sendo, se a resistência à tração e a tensão-deformação forem os únicos parâmetros a serem avaliados em um determinado experimento, as córneas suínas podem ser utilizadas como modelo experimental em substituição às humanas.

Lesões ulcerativas e tratamentos

Processos mórbidos que causam perda tecidual na córnea geralmente evoluem para a ceratite ulcerativa, que pode se estender para as camadas mais profundas, com risco de perfuração do bulbo ocular (KEAY *et al.*, 2006). As ceratites ulcerativas normalmente são causadas por traumas físicos provenientes de agentes extracorpóreos, de alterações palpebrais e ciliares (SLATTER, 2005; KEAY *et al.*, 2006). Traumas por produtos químicos também podem dar origem a úlceras que são de difícil reparação (LU *et al.*, 2009). Outros fatores já citados como causas de ceratite ulcerativa são a ceratoconjuntivite seca (TSVETKOV E TERESHCHENKOVA, 2001), a ausência da sensibilidade corneal, conhecida como úlcera neurogênica (MOON *et al.*, 2011), a utilização de lente de contato (HINGORANI *et al.*, 1995) e agentes infecciosos como o herpes vírus (XIA *et al.*, 2010).

O objetivo do tratamento clínico na ceratite ulcerativa é potencializar e estimular a regeneração corneal espontânea, prevenir infecções e suprimir o espasmo ciliar (SLATER, 2005).

A conduta terapêutica se inicia com a determinação e tratamento da etiologia da úlcera. Úlceras superficiais geralmente são tratadas apenas com medicação tópica, envolvendo os antimicrobianos para combater infecções e a atropina (1%) para aliviar o espasmo ciliar e a dor (KERN, 2004, SLATTER, 2005). As úlceras profundas, não progressivas, também podem ser resolvidas somente com tratamento clínico. A antibioticoterapia tópica deve ter uma frequência inicial maior, reduzindo progressivamente com a melhora do quadro. Concomitante ao antibiótico, agentes antiproteases e moduladores de crescimento são recomendados (KERN, 1990; GELATT, 2003; KERN, 2004; BENTLEY e MURPHY, 2004).

No que se refere à antibióticoterapia, deve-se ter cuidado com a escolha do agente e com a frequência de aplicação, pois alguns deles podem apresentar um efeito tóxico no epitélio corneal. Sosa *et al.*, (2008) estudaram a toxicidade de soluções oftálmicas de diversas fluoroquinolonas, como a moxifloxacina, a gatifloxacina, a levofloxacina, a ofloxacina e a ciprofloxacina. Eles concluíram que todos os agentes apresentaram algum efeito tóxico nas células do epitélio corneal e da conjuntiva de humanos.

Em ulcerações mais complicadas, de difícil cicatrização e principalmente quando há o risco de perfuração ocular, a intervenção cirúrgica deve ser realizada. Algumas técnicas são muito empregadas, como o “flap” de terceira pálpebra, o recobrimento livre e pediculado de conjuntiva e o enxerto lamelar de córnea (GELATT, 2003, BRAGA *et al.*, 2004). Existem estudos que utilizaram materiais biológicos para recobrir a úlcera e melhorar as condições da cicatrização, tais como a escama de sardinha (LAUS *et al.*, 2000), a membrana amniótica (PONTES, 2010; PONTES *et al.*, 2012), a mucosa oral (DAMASCENO *et al.*, 2004), entre outros.

Biomateriais sintéticos também estão sendo testados para auxiliar na reparação da córnea. Entre esses, estão o n-butil 2-cianoacrilato associado à membrana amniótica xenógena (PONTES, 2010), a poliuretana derivada do óleo de mamona (MORALES *et al.*, 2005), a membrana de quitosana (COSTA *et al.*, 2006) e a celulose bacteriana (MACEDO *et al.*, 2010).

Resposta tecidual à lesão

A reparação da córnea se inicia logo após a lesão. Trata-se de um complexo processo envolvendo mudanças celulares e liberação de moléculas sinalizadoras pelas células de todas as camadas. Tal sinalização é reforçada pelas glândulas lacrimais e pelas células inflamatórias recém chegadas (QAZI *et al.*, 2010).

Quando a lesão se restringe apenas ao epitélio, a cura é rápida e eficaz. A reepitelização se dá por meio de três processos que são: a migração de células em direção ao centro da ferida, a mitose das células basais e a diferenciação de células tronco vindas do limbo (QAZI *et al.*, 2010). Em coelhos, a reepitelização é extremamente rápida, como comprovada pelo estudo feito por Pfister (1975), que observou a reparação de defeitos com 6 mm de diâmetro em 55 horas, e recuperação da espessura normal do epitélio em 114 horas.

Em lesões que atingem o estroma, o evento inicial é a apoptose dos ceratócitos nas imediações da lesão. Em seguida, chegam células inflamatórias para a remoção de detritos, ao mesmo tempo em que acontece a transformação dos ceratócitos localizados nas áreas adjacentes em fibroblastos, que iniciam a secreção de matriz extracelular na área lesionada. Muitos desses se tornam miofibroblastos que adquirem características contráteis, com finalidade de aproximar o tecido cicatricial finalizando a reparação. Com o tempo, os miofibroblastos entram em apoptose, permanecendo apenas os ceratócitos comuns ao tecido (JESTER *et al.* 1999; LORENA *et al.*, 2002; QAZI *et al.*, 2010).

As enzimas proteolíticas estão diretamente envolvidas na restauração dos tecidos. Especificamente para a córnea, existem dois grupos principais: o da proteinase serina, incluindo a plasmina e seus componentes; e o das enzimas que requerem cofator metal, que correspondem à collagenase e à metaloproteinase da matriz. A primeira é responsável pela clivagem de proteínas da matriz, como a fibronectina e a laminina, e pode influenciar na migração celular. As collagenases e as metaloproteinases da matriz degradam e desnaturam o colágeno. Estas enzimas são importantes para a manutenção da transparência da córnea, pois atuam na remodelação e na organização da arquitetura original das fibras de colágeno (PONTES *et al.*, 2011).

Por ser avascular, a reparação da lesão corneal profunda é lenta e crônica, como mostra o estudo de Acosta *et al.* (2006), que acompanharam três gatos durante seis meses, após terem sido submetidos à ceratectomia anterior profunda. Nesse estudo, os autores observaram a reepitelização completa entre cinco e oito semanas, com o estroma se aproximando da espessura normal somente após três meses.

Quando a lesão é crônica, a liberação de mediadores químicos é mais intensa. Nesta situação, ocorre migração importante de macrófagos e neutrófilos para o interior da lesão, e consequente liberação de fatores proangiogênicos (IL-1 IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α , entre outros). Tal fato descontrola o equilíbrio entre as moléculas antiangiogênicas e proangiogênicas, resultando na vascularização a partir do plexo

vascular limbal. Os vasos recém formados avançam até a área lesionada para acelerar a reparação (LU *et al.*, 2009; ELLENBERG *et al.*, 2010).

Se não for lesado, o endotélio também responde às agressões na córnea liberando mediadores químicos. Se for comprometido, o defeito é recoberto pela migração e alargamento das células vizinhas saudáveis, pois a capacidade mitótica do endotélio é limitada. A regeneração endotelial varia de acordo com a espécie. As células endoteliais dos coelhos têm alta atividade mitótica, nos cães, a regeneração é bastante restrita e nos gatos é ainda menor que nos cães (VAN HORN *et al.*, 1977; SLATTER, 2005; QAZI *et al.*, 2010). Um aspecto a ser considerado na regeneração endotelial é a idade. Com avançar do tempo, há uma diminuição fisiológica do número de células endoteliais, fazendo com que a regeneração dessa camada torne-se ainda menos eficiente (BÖHRINGER *et al.*, 2002; SCHWARTZKOPFF *et al.*, 2010).

Biomateriais

Um biomaterial pode ser definido como parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo (HELMUS e TWEDEN, 1995). Conforme definição da ANVISA, grande parte dos materiais de uso em saúde são enquadrados como biomateriais. Tais como: próteses, lentes de contato, implantes, *stents*, cateteres, tubos de circulação extra-corpórea e arcabouços (*scaffolds*) empregados na engenharia de tecidos, entre outros (SOARES, 2005).

O desafio dos biomateriais é substituir estruturas cujas propriedades físicas são resultado de milhões de anos de evolução adaptativa às suas funções e ao meio. Os biomateriais podem ser cuidadosamente selecionados entre o grupo dos metais, das cerâmicas e dos polímeros, buscando-se aqueles que possuam estrutura física semelhante a dos tecidos. Foi criado um quarto grupo de biomateriais, os compósitos, que consiste na associação de dois ou mais componentes com o objetivo de melhorar as características físico-químicas dos implantes, para que esses interajam melhor com os tecidos (HENCH, 2006).

Aplicação de biomateriais na córnea

Na oftalmologia, os biomateriais são em grande parte estudados com o objetivo de substituição tecidual (LLOYD *et al.*, 2001; RUBERTI *et al.*, 2011). Outras linhas de pesquisa envolvem a produção de dispositivos para liberação controlada de drogas (BOURGES *et al.*, 2006; CREMONINI, 2008, NATU *et al.*, 2011), produção de

sistema de drenagem para tratamento do glaucoma (LÖBLER *et al.*, 2011) e o recobrimento de úlceras para auxiliar a cicatrização (MACEDO *et al.*, 2010).

Um biomaterial, para funcionar adequadamente como implante duradouro na córnea, deve permitir o crescimento epitelial na sua superfície, não desencadear resposta imune ou mutagênica e não pode estimular a formação de cápsula fibrosa. O material também necessita ter resistência física compatível com o tecido natural, além de permitir a adesão de fibroblastos e a deposição de matriz extracelular (LLOYD *et al.*, 2001; TANURE, 2006). Sugere-se que o implante intracorneal possua vasta porosidade, com poros medindo no mínimo 50 nm para permitir a integração, sendo 100 nm o tamanho ideal para a nutrição do estroma sobrejacente ao implante (SWEENEY *et al.*, 1998). Segundo Wu *et al.* (1998), os poros podem também contribuir para melhorar a biocompatibilidade dos implantes. Ainda, segundo Crawford *et al.* (1993), a estrutura física do dispositivo deve se assemelhar com a forma anatômica do tecido receptor, principalmente nas bordas, para evitar necrose e extrusão.

Vários materiais diferentes foram testados como implantes intracorneais. Dentre eles, a poliuretana derivada do óleo de mamona ao ser aplicada na córnea, não apresentou sinais de toxicidade e observou-se baixo grau de resposta inflamatória (MORALES *et al.*, 2005). Córneas biossintética com base no Poli (N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico-co-acriloxisuccinamida) associado a copolímeros de colágeno foram produzidas e implantadas em córneas de cães. O biomaterial resultante permitiu o recobrimento epitelial com boa arquitetura das células basais, integração satisfatória com vasta distribuição de fibroblastos, observando-se ainda a neoformação de fibras nervosas intra-implante (BENTLEY *et al.*, 2010). Outro exemplo é o compósito com base no hidrogel (poli - álcool vinílico) e na nano-hidroxiapatita produzido com o intuito de melhorar a integração da ceratoprótese com o tecido corneal. O material permitiu o crescimento de tecido e de vasos através dos poros, sem formação de cápsula fibrosa, melhorando a biocompatibilidade do conjunto (FENGLAN *et al.*, 2007).

A córnea apresenta características físicas bastante particulares, assim, o biomaterial para ser-lhe compatível deve possuir propriedades semelhantes às suas. Em suma, os polímeros atendem bem esse a pré-requisito e estão sempre envolvidos no preparo de dispositivos para implantação na córnea (LLOYD *et al.*, 2001; RUBERTI *et al.*, 2011). Assim, ensaios de biocompatibilidade são relatados com a membrana de quitosana (COSTA *et al.*, 2006), o poli (etileno glicol) associado ao poli (ácido acrílico) para substituição tecidual (HARTMANN *et al.*, 2011), o perfluoropoliéter como

implante intracorneal para corrigir erros de refração (EVANS *et al.*, 2011) e o polimetacrilato hidrogel com a superfície modificada por aminas e revestimento com diferentes proteínas da matriz extracelular (colágenos tipo I e IV, laminina e fibronectina), para avaliar a reepitelização corneal *in vitro* (MA *et al.*, 2011).

Pippi e Sampaio (1990) estudaram a membrana de celulose bacteriana na ceratoplastia lamelar. Eles consideraram que o material seria apto para a função por ser semipermeável, resistente e biocompatível. A membrana foi aplicada em lesões superficiais em córneas de coelhos sem método de fixação. Houve casos de perda e retração do implante, mas a maioria se aderiu mostrando boa interação. Apenas avaliação clínica foi conduzida, ficando constatado que a reparação foi mais rápida quando o biomaterial permaneceu por mais tempo. Macedo *et al.* (2010) utilizaram o mesmo material em recobrimento de úlcera, porém, com suturas para a fixação. A análise histológica mostrou interação favorável com o tecido e baixo grau de inflamação. Identificou-se também a presença de numerosos fibroblastos em torno do biomaterial. Ao final do estudo, foi constatada a organização do colágeno e do epitélio.

Polímeros

Polímero é uma macromolécula formada pela repetição de pequenas e simples unidades químicas, denominadas de monômeros. Quando há na sua estrutura apenas um tipo de monômero, este é classificado como homopolímero. Se tipos diferentes estão na fórmula, este é então chamado de copolímero. O arranjo dos monômeros diferencia os tipos de cadeias que podem ser classificadas como lineares, ramificadas e em rede. A variação do tamanho da cadeia, ou seja, da massa molar, é o aspecto principal que confere a esse grupo uma série de características que o diferencia dos outros materiais (WILKS, 2000; ORÉFICE, 2006).

Atualmente, os polímeros formam o grupo de biomateriais mais pesquisados em aplicações biomédicas, sejam isolados ou integrando compósitos (COSTA *et al.*, 2006; CARLO *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2011). Comumente chamados de biopolímeros, eles podem ser adequados em termos de propriedades a cada aplicação específica, graças às características físico-químicas e sua versatilidade estrutural. A possibilidade de alterar algum agrupamento químico da cadeia, por exemplo, pode viabilizar o estabelecimento de alguma interação específica entre o biomaterial e o tecido (ORÉFICE, 2006).

Além de serem funcionalmente ativos, ou seja, cumprirem com sucesso suas funções no corpo, para serem usados como biomateriais, os polímeros devem ser

biocompatíveis. Essa biocompatibilidade depende de quatro fenômenos: (1) processo de concentração de biomacromoléculas junto à superfície dos materiais (adsorção), logo após a implantação destes no corpo; (2) resposta local do tecido à presença do biomaterial (resposta inflamatória e imunológica); (3) efeito do ambiente corpóreo no material (degradação ou não do polímero); (4) resposta do corpo como um todo à presença do biomaterial (aparecimento de tumores, alergias, infecções generalizadas, etc.) (U.S. CONGRESS, 1993; ORÉFICE, 2006).

Atualmente, existe uma grande preocupação em se obter biopolímeros a partir de fontes renováveis, baratas e que não agredam o meio ambiente (U.S. CONGRESS, 1993). Exemplos desses são: a celulose bacteriana e a policaprolactona.

Membrana de celulose bacteriana

A bactéria gram-negativa *Acetobacter xylinum* foi descrita pela primeira vez em 1886 por Brown, que percebeu uma manta gelatinosa formada na superfície do caldo que era fermentado para produzir vinagre. Ao estudar a composição do material, ele identificou uma estrutura química semelhante à celulose vegetal. Quando observado à microscopia, notou bactérias entremeadas nas fibras de celulose (KLEMM *et al.*, 2001). Os estudos com a celulose bacteriana (CB) e a produção em maior escala se intensificaram a partir da década de 1960, pelo fato de se tratar de um polímero biodegradável, flexível, semipermeável, semitransparente e hidrofílico (SWISSA *et al.*, 1980; FONTANA *et al.*, 1990).

Assim como a celulose de plantas, a CB é um homopolissacarídeo linear (Figura 1.3) quimicamente composta por monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4), onde as unidades repetidas são conhecidas como celobiose (SAXENA e BROWN JR, 2008). Apenas a estrutura química da celulose da bactéria é idêntica à da planta, sendo diferente em vários outros aspectos, como no fato de ser livre de lignina, hemicelulose, pectina e outros produtos biogênicos. A CB também se diferencia da celulose vegetal pela alta cristalinidade, absorção de água, estrutura em rede ultrafina e possibilidade de ser moldada *in situ* (KLEMM *et al.*, 2001).

A bactéria atualmente denominada *Gluconacetobacter xylinus*, aeróbia gram-negativa, é o único microorganismo capaz de produzir celulose em forma de fibras e em quantidade comercial (KLEMM *et al.*, 2006). Ela se utiliza de fontes de glicose para produzir uma estrutura em rede ultrafina, formada por microfibras de celulose excretada como matriz extracelular, a qual se localiza na interface entre o meio de cultura e o ar (VANDAMME *et al.*, 1998; KLEMM *et al.*, 2001). O meio de cultivo deve ser

composto por fonte de carboidrato (sacarose, glicose, frutose, lactose, manitol), além de extrato de levedura para o fornecimento de nitrogênio (peptona, polipeptona, triptona, etc) (YAMADA *et al.*, 1997).

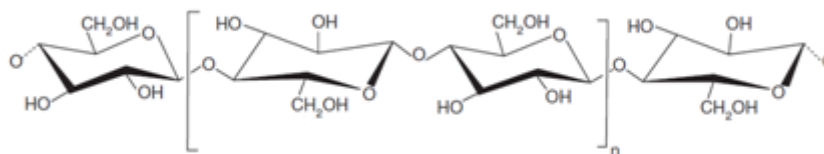


Figura 1.3. Fórmula estrutural da celulose com suas ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4). Entre colchetes destaca-se a celobiose, unidade básica de repetição na cadeia (SAXENA e BROWN JR, 2008).

Em meio de cultivo estático, a 28°C, a membrana começa a ser formada em torno de 8 dias, e se completa atingindo o máximo de proveito do meio de cultura próximo aos 14 dias. Sua espessura pode ser determinada pelo tempo de cultivo. Ao final do processo, a manta de celulose apresenta uma característica gelatinosa com 99% de umidade e 1% de celulose (BUDHIONO *et al.*, 1999). A retirada das bactérias da membrana no estado úmido pode ser realizada através do tratamento em meio alcalino, seguido por repetidas lavagens em água destilada (BARUD, 2010). Após secagem em estufa, a CB apresenta apenas 6% da capacidade de retenção de água; no entanto, se for seca por liofilização, a CB pode sustentar até 70% da capacidade de absorção de umidade (KLEMM *et al.*, 2005). Além de biodegradável, a membrana também é semipermeável, semitransparente, flexível e altamente hidrofílica, propriedades que incitaram estudos com o material em aplicações biológicas (FONTANA *et al.*, 1990; CZAJA *et al.*, 2006).

Helenius *et al.* (2006) implantaram a CB no tecido subcutâneo de ratos para avaliar sua biocompatibilidade. Durante um período de até 12 semanas de acompanhamento, os pesquisadores não observaram sinais clínicos de inflamação (edema, vermelhidão ou exsudato). Também foram realizados exames histológicos, onde foram observadas populações de células correspondentes a fibroblastos, não havendo grande quantidade de células inflamatórias, a não ser pelo aparecimento esporádico de macrófagos ED1(CD68) identificados por técnica de histoquímica. Essa técnica também foi utilizada para identificar células ED2 (CD163) e a SM α -actina expressa por miofibroblastos, mas elas não foram expressas. Houve integração do implante, crescimento de tecido conjuntivo e de vasos sanguíneos sobre a membrana, o que permitiu concluir que a CB é biocompatível e que a resposta inflamatória estimulada por ela não foi significativa.

As primeiras aplicações biomédicas da CB aconteceram na década de 1980. A membrana foi utilizada como substituto temporário de pele em grandes perdas teciduais, em queimaduras e em úlceras de difícil cicatrização. Ela atuou protegendo e conferindo suporte à reepitelização, com resultados bastante favoráveis, dando origem a produtos comerciais como o Biofill® e o Gengiflex® (BioFill Produtos Biotecnológicos, Curitiba, PR Brasil), utilizados para auxiliar a recuperação de diversos tipos de feridas (REBELLO *et al.*, 1987; FONTANA *et al.*, 1990; NOVAES *et al.*, 1993; CZAJA *et al.*, 2007).

A CB é insolúvel em água e sua degradação é realizada por enzimas fúngicas ou bacterianas. Nos tecidos animais a degradação da celulose é limitada, pois é dependente de hidrolases que atacam as ligações glicosídicas β -(1→4), enzimas que os tecidos do organismo animal não possui. No entanto, é possível introduzir partículas modificadoras durante a síntese da CB para melhorar a sua degradabilidade *in vivo* (YADAV *et al.*, 2010). Outros estudos buscam incorporar celulasas na CB depois de pronta, com o intuito de que as enzimas sejam ativadas na temperatura e no pH corporal, iniciando a hidrólise do biomaterial após a implantação (HU e CATCHMARK, 2011). Foi constatado por Reddy *et al.* (1997) que a degradação *in vivo* da CB modificada está diretamente relacionada com a ação de macrófagos.

Devido à possibilidade de se produzir estruturas com formatos tridimensionais, tubos foram obtidos a partir da CB para substituir segmentos de vasos sanguíneos. Depois de implantado no estado úmido, o biomaterial permitiu o crescimento de endotélio vascular em seu interior, a cobertura superficial com tecido conjuntivo indicando a boa integração, e causou resposta inflamatória leve (KLEMM *et al.*, 2001; WIPPERMANN *et al.*, 2009).

Dispositivos cilíndricos da CB foram utilizados para recobrir anastomoses de nervos ciáticos em ratos. Após o período de acompanhamento foram realizadas coletas de amostras musculares dos membros operados para mensuração da massa muscular por meio de seu peso. Como resultado, foi obtida maior quantidade de massa muscular no grupo tratado em relação ao controle. Concluindo-se então, que a CB acelerou a retomada da função nervosa (KLEMM *et al.*, 2001).

Novaes *et al.* (1993) descreveram o acompanhamento clínico da utilização do Gengiflex®, produto à base de celulose bacteriana, no tratamento de lesões de furca de classe II em cães. Os autores concluíram que a presença do material acelerou o processo de cura da doença quando comparado a animais não tratados. Silva *et al.* (2012) utilizaram a CB como mantas em alvéolos dentários de gatos após a extração de pré-

molares, com ou sem preenchimento por hidroxiapatita (HAP-91), com a intenção de evitar a saída da HAP-91 e auxiliar a cicatrização da gengiva. A membrana manteve-se no local entre oito e 21 dias, evitando a exposição da HAP-91, e ainda pode ter evitado a diminuição da crista no período avaliado. Iamaguti e Brandão (2007) apresentaram vários outros estudos onde a CB foi utilizada na regeneração ortopédica guiada.

Membranas de CB foram utilizadas para ocluir perfurações em septos nasais de coelhos. Os autores relataram que a CB foi bem integrada ao tecido, apresentando resposta inflamatória de grau leve a moderado, com presença de polimorfonucleares e células gigantes. Dentro desse contexto, o biomaterial foi considerado biocompatível, contribuindo para o fechamento do septo nasal dos coelhos (AMORIM *et al.*, 2009).

Cremonini (2008) utilizou a CB como lente de contato com liberação gradual de antibiótico para tratar ceratite bacteriana experimental em cães. O biomaterial, impregnado com ofloxacina promoveu liberação gradual da droga, entretanto os valores obtidos pela análise foram inferiores aos olhos tratados com colírio, mas suficientes para controlar a infecção por *Staphylococcus aureus*. O exame histopatológico das córneas revelou afinamento epitelial com formação de microcistos, edema corneano e infiltrado inflamatório. Concluiu-se assim, que o dispositivo não foi adequado para a função proposta.

Membranas da CB também foram utilizadas como recobrimento de úlceras experimentais em córneas de coelhos. Os animais tratados com a CB apresentaram cicatrização mais rápida do que os não tratados (PIPPI e SAMPAIO, 1990; MACEDO *et al.*, 2010).

Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) é um poliéster linear, alifático (não contém anéis aromáticos) e semicristalino, conhecido por ser biocompatível e bioreabsorvível, por ter baixo ponto de fusão (60°C), por apresentar boas características mecânicas e por ter um período de degradação considerado longo. É um material útil na produção de suturas reabsorvíveis e na engenharia de tecidos (ELZEIN *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2006; POK *et al.*, 2010). A PCL é um dos biopolímeros mais hidrofóbicos disponíveis no mercado, sendo muito utilizado para formar compósitos com biopolímeros hidrofílicos (SARASAM e MADIHALLY, 2005).

A PCL apresenta duas fases de degradação quando é aplicada no organismo vivo. A primeira acontece por meio da cisão hidrolítica das ligações ésteres, iniciando-se preferencialmente nas regiões amorfas do polímero, causando diminuição do peso

molecular e tendo como subproduto gerado o ácido caprônico (Figura 1.4), que é absorvido e eliminado (BOSWORTH e DOWNES, 2010). A segunda fase inicia-se após a diminuição do peso molecular, próximo de 5000 u (SUN *et al.*, 2006), quando o polímero é atacado por enzimas ésteres afins, como as lípases, que promovem a clivagem nos grupos ésteres pela sua semelhança estrutural com os lipídios (BOSWORTH e DOWNES, 2010).

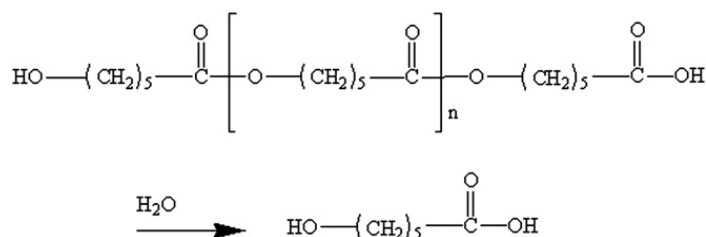


Figura 1.4. Fórmula estrutural da PCL. Sua hidrólise (entre colchetes) e formação do ácido caprônico (BOSWORTH e DOWNES, 2010).

Sun *et al.* (2006) estudando a degradação da PCL no subcutâneo de ratos. Eles constataram que o peso molecular da PCL diminuiu de 66000 u para 24000 u em 480 dias, caindo para 15000 u em 24 meses, sendo ainda preservada a estrutura do implante. As amostras apresentaram-se quebradiças ao atingirem o peso molecular de 8000 u em 30 meses e, por fim, em 36 meses foram encontrados apenas fragmentos do dispositivo. O mesmo trabalho reporta o mecanismo e o tempo de excreção após aplicação subcutânea da PCL de baixo peso molecular (3000 u). Foram encontrados indícios do material no plasma sanguíneo após 15 dias, observando-se a concentração plasmática máxima aos 45 dias, seguido pelo decréscimo até não ser mais encontrado após 165 dias. Os seus metabólitos são eliminados em grande maioria pelas fezes, onde se identificou 91,7 % do material implantado em 135 dias. Não se observou acúmulo de metabólitos em nenhum dos órgãos avaliados, concluindo que a PCL, quando metabolizada, não acumula e é rapidamente excretada pelo organismo.

É vasto o campo de possibilidades para utilização da PCL na medicina. Encontra-se grande número de trabalhos envolvendo sua utilização na produção de dispositivos para liberação controlada de drogas; pois, para esse fim, o dispositivo deve permanecer estável por longos períodos, ou seja, sua degradação deve ser lenta (BOURGES *et al.*, 2006; NATU *et al.*, 2011). WILLIAMS *et al.* (2005) sintetizaram e caracterizaram uma matriz porosa de PCL para aplicações ortopédicas. Neste estudo foi demonstrada facilidade na manipulação do biomaterial, abundância de poros, adesão e crescimento celular, com propriedades mecânicas suficientes (módulo de compressão de

52 a 67 MPa) para aplicação no tecido ósseo. Matrizes de PCL foram preparadas com impregnação de heparina e fator de crescimento vascular (VEGF), avaliando-se a sua capacidade de induzir neovascularização. Após sete a 14 dias de implantação no subcutâneo de ratos, os dispositivos tratados com heparina e VEGF demonstraram vascularização significativamente mais intensa do que os não tratados, com vasos funcionais e estáveis (SINGH *et al.*, 2011).

Um estudo foi feito para identificar mudanças nas propriedades da PCL após esterilização por radiação gama. Houve aumento do módulo de elasticidade mecânica e diminuição da taxa de degradação, porém não houve alteração na capacidade de adesão celular. Assim, a radiação gama pode ser utilizada para esterilizar dispositivos produzidos com a policaprolactona, pois esse método não causa grandes mudanças que impossibilitem sua aplicação biomédica (COTTAM *et al.*, 2009).

Considerações finais

As particularidades físicas da córnea, tais como transparência e viscoelasticidade, são resultados não só dos seus componentes estruturais, mas também do seu modelo fisiológico, como o rigoroso controle da hidratação e a ausência de vasos. Esses fatores fazem com que os biomateriais para serem aplicados na córnea tenham que atender uma série de pré-requisitos. Dentre eles, além da biocompatibilidade, destacam-se a transparência e a maleabilidade. A celulose bacteriana (CB) forma membranas flexíveis, biocompatíveis e hidrofílicas, características que podem favorecer seu uso na córnea. Porém, a transparência e a elasticidade da CB são limitadas. Assim, a policaprolactona (PCL), um polímero biocompatível, viscoelástico, hidrofóbico e que pode ter seu peso molecular regulado, representa uma opção para melhorar as características da CB antes de ser aplicada na córnea, já que é muito utilizada para integrar compósitos em associação com biomateriais hidrofílicos.

Referências

ACOSTA, A.C.; ESPANA, E.M.; STOIBER, J.; LAMAR, P.D.; MARANGON, F.; ALFONSO, E.; PAREL, J.M. Corneal Stroma Regeneration in Felines After Supradescemetic Keratoprosthesis Implantation. **Cornea**, v. 25, n. 7, p. 830-838, 2006.

AMORIM, W.L.; COSTA, H.O.; SUZA, F.E.; CASTRO, M.G.; SILVA, L. Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 2, p. 200-207, 2009.

BARUD, H.S. **Novos materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana**. 2010. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara - São Paulo, Brasil, p. 172.

BENTLEY, E.; MURPHY, C.J. Topical therapeutic agents that modulate corneal wound healing. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**, v.34, n.3, p.623-638, 2004.

BENTLEY, E.; MURPHY, C.J.; LI, F.; CARLSSON, D.J.; GRIFFITH, M. Biosynthetic corneal substitute implantation in dogs. **Cornea**, v. 29, n. 8, p. 910-916, 2010.

BÖHRINGER, D.; REINHARD, T.; SPELSBERG, H.; SUNDMACHER, R. Regeneration of corneal endothelium following complete endothelial cell loss in rat keratoplasty. **British Journal of Ophthalmology**, v. 86, n. 1, p. 35-38, 2002.

BOSWORTH, L.A. e DOWNES, S. Physicochemical characterisation of degrading polycaprolactone scaffolds. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 12, p. 2269-2276, 2010.

BOURGES, J.L.; BLOQUEL, C.; THOMAS, A.; FROUSSART, F.; BOCHOT, A.; AZAN, F.; GURNY, R.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN, F. Intraocular implants for extended drug delivery: Therapeutic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 11, p. 1182-1202, 2006.

BRAGA, F.V.A.; PIPPI, N.L.; GOMES, K.; WEISS, M.; FLORES, F.; DALMOLIN, F.; SEVERO, D.; KRAUSPENHAR, L.; LEOTTE, A. Ceratoplastia com enxerto autógeno lamelar livre de córnea e pediculado de conjuntiva fixados com adesivo de cianoacrilato em cães. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1119-1126, 2004.

BUDHIONO, A.; ROSIDI, B.; TAHER, H.; IGUCHI, M. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, n. 2, p. 137-43, 1999.

CARLO, E.C.; BORGES, A.P.B.; VARGAS, M.I.V.; MARTINEZ, M.M.; ELEOTÉRIO, R.B. Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% polihidroxibutirato para substituição óssea em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, n. 4, p. 844-852, 2009.

COSTA, T.A.C.; ANDRADE, A.L.; BINOTTO, T.E.; PLEPIS, A.M.G.; BEVILACQUA, L.; SOUZA, W.M. Avaliações clínica e morfométrica da capacidade angiogênica da membrana de quitosana em córneas de coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, n. 6, p. 817-821, 2006.

COTTAM, E.; HUKINS, D.W.L.; LEE, K.; HEWITT, C.; JENKINS, M.J. Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material. **Medical Engineering & Physics**, v. 31, n. 2, p. 221-226, 2009.

CRAWFORD, G.J.; CONSTABLE, I.J.; CHIRILA, T.V.; VIJAYASEKARAN, S.; THOMPSON, D.E. Tissue interaction with hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea. **Cornea**, v. 12, n. 4, p. 348-357, 1993.

CREMONINI, D.N. **Lente de contato biossintética com liberação gradual de ofloxacina para tratamento de ceratite experimental por staphylococcus aureus em**

- ções.** 2008. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - Botucatu, São Paulo, Brasil, p. 88.
- CZAJA, W.; KRYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR, R.M. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.
- CZAJA, W.K.; YOUNG, D.J.; KAWECKI, M.; BROWN JR, R.M. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.
- DAMASCENO, A.D.; CHAVES, N.S.T.; ATHAYDE, I.B.; PRADO, V.R.C. Estudo clínico e histológico da mucosa oral autógena na ceratoplastia lamelar experimental. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 2, p. 117-124, 2004.
- DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**, 3 ed. Rio de Janeiro, Elsevier Editora Ltda, p. 318-328, 2004.
- ELLENBERG, D.; AZAR, D.T.; HALLAK, J.A.; TOBAIGY, F.; HAN, K.Y.; JAIN, S.; ZHOU, Z.; CHANG, J.H. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, n. 3, p. 208-248, 2010.
- ELZEIN, T.; NASSER-EDDINE, M.; DELAITE, C.; BISTAC, S.; DUMAS, P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 273, n. 2, p. 381-387, 2004.
- EVANS, M.D.; PRAKASAM, R.K.; VADDAVALLI, P.K.; HUGHES, T.C.; KNOWER, W.; WILKIE, J.S.; MCLEAN, K.M.; JOHNSON, G.; MCFARLAND, G.A.; XIE, R.Z.; SWEENEY, D.F. A perfluoropolyether corneal inlay for the correction of refractive error. **Biomaterials**, v.32, n. 12, p.3158-3165, 2011.
- FANG, Y.D.; XIAO, M.; FEI, H.Y. Implantation of hydroxyapatite–titanium corneal implants in rat cornea. **Cornea**, v. 30, n. 1, p. 67-72, 2011.
- FENGLAN, X.; YUBAO, L.; XIAOMING, Y.; HONGBING, L.; LI, Z. Preparation and in vivo investigation of artificial cornea made of nano-hydroxyapatite/poly (vinyl alcohol) hydrogel composite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 4, p. 635-640, 2007.
- FONTANA, J.D.; DE SOUZA, A.M.; FONTANA, C.K.; TORRIANI, I.L.; MORESCHI, J.C.; GALLOTTI, B.J.; DE SOUZA, S.J.; NARCISCO, G.P.; BICHARA, J.A.; FARAH, L.F. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-25, n. 1, p. 253-264, 1990.
- GELATT, K.N. **Manual de oftalmologia veterinária**. 1 ed., Barueri-SP, Malone, p. 125- 130, 2003.
- GLASS, H.; ROBERTS, C.R.; LITSKY, A.S.; WEBER, P.A. A Viscoelastic Biomechanical Model of the Cornea Describing the Effect of Viscosity and Elasticity on Hysteresis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science, September**, v. 49, n. 9, p. 3919-26, 2008.

GRIFFITH. M.; JACKSON, W.B.; LAGALI, N.; MERRETT, K.; LI, F.; FAGERHOLM, P. Artificial corneas: a regenerative medicine approach. **Eye**, v. 23, 1985–1989, 2009.

HARTMANN, R.; WATANABE, R.; ZHENG, L.L.; KIM, C.Y.; BECK, S.E.; HUIE, P.; NOOLANDI, J.; COCHRAN, J.R.; TA, C.N.; FRANK, C.W. Toward the development of an artificial cornea: Improved stability of interpenetrating polymer networks. **Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials**, v. 98, n. 1, p. 8-17, 2011.

HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 76, n. 2, p. 431-438, 2006.

HELMUS, M.N.; TWEDEN, K. “Materials Selection”, *In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, part A, v. 1, p.27-59, 1995.

HENCH, L.L. Biomateriais: Uma introdução. *In: ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. Biomateriais; fundamentos e aplicações*. Cultura Médica, p. 1-7, Rio de Janeiro, 2006.

HINGORANI, M.; CHRISTIE, C.; BUCKLEY, R. Ulcerative keratitis in a person wearing daily disposable contact lenses. **British Journal of Ophthalmology**, v. 79, n. 12, p. 1138-1148, 1995.

HOELTZEL, D.A.; ALTMAN, P.; BUZARD, K.; CHOE, K. Strip extensiometry for comparison of the mechanical response of bovine, rabbit and human corneas. **Transactions of the ASME**, v. 114, n. 2, p. 202-215, 1992.

HU, Y. e CATCHMARK, J.M. In vitro biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2835–2845, 2011.

IAMAGUTI, L.S. e BRANDÃO, C.V.S. Uso de membrana biossintética a base de celulose na regeneração tecidual guiada. Revisão. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 4, p. 701-708, 2007.

JESTER, J.V.; PETROLL, W.M.; CAVANAGH, H.D. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts, **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 18, n. 3, p. 311–356, 1999.

KEAY, L.; EDWARDS, K.; NADUVILATH, T.; TAYLOR, H.R.; SNIBSON, G.R.; FORDE, K.; STAPLETON, F. Microbial keratitis. Predisposing factors and morbidity. **Ophthalmology**, v.113, n.1, p.109-116, 2006.

KERN, T.J. Ulcerative keratitis. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**, v.20, n.3, p.643-66, 1990.

KERN, T.J. Antibacterial agents for ocular therapeutics. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**, v.34, n.3, p.655-668, 2004.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie**, v. 44, n. 22, p. 3358-93, 2005.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HEBLER, N.; HORNING, M. SCHMAUDER, H-P.; MARSCH, S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Advances in Polymer Science**, v. 205, p. 49-96, 2006.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v.26, n.9, p.1561-1603, 2001.

LAUS, J.L.; FERREIRA, A.L.; ANDRADE, A.L. Emprego de escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) conservada em glicerina, em ceratoplastias lamelares experimentais em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.1, p. 00, 2000.

LLOYD, A.W.; FARAGHER, R.G.A.; DENYER, S.P. Ocular biomaterials and implants. **Biomaterials**, v. 22, n.8, p. 769-785, 2001.

LÖBLER, M.; STERNBERG, K.; STACHS, O.; ALLEMANN, R.; GRABOW, N.; ROOCK, A.; KREINER, C.F.; STREUFERT, D.; NEFFE, A.T.; HANH, B.D. Polymers and drugs suitable for the development of a drug delivery drainage system in glaucoma surgery. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**. v. 97, n. 2, p. 388-395, 2011.

LORENA, D.; UCHIO, K.; COSTA, A.M.; DESMOULIERE, A. Normal scarring: Importance of myofibroblasts. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, n. 2, p. 86-92, 2002.

LU, P.; LI, L.; LIU, G.; VAN ROOIJEN, N.; MUKAIDA, N.; ZHANG, X. Opposite Roles of CCR2 and CX3CR1 Macrophages in Alkali-Induced Corneal Neovascularization. **Cornea**, v. 28, n. 5, p. 562-9, 2009.

MA, A.; ZHAO, B.; BENTLEY, A.J.; BRAHMA, A.; MACNEIL, S.; MARTIN, F.L.; RIMMER, S.; FULLWOOD, N.J. Corneal epithelialisation on surface-modified hydrogel implants artificial cornea. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 3, p. 663-670, 2011.

MACEDO, L.R.; RIBEIRO, A.P.; CONCEIÇÃO, L.F.; GALERA, P.D.; LAUS, J.L. Experimental lamellar keratoplasty in rabbits using microfibrillar cellulose membrane. Clinical, morphological and immunohistochemical findings. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.378-383, 2010.

MANO, J.F.; SOUSA, R.A.; BOESEL, L.F.; NEVES, N.M.; REIS, R.L.; Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. **Composites Science and Technology**, v. 64, n. 6, p. 789-817, 2004.

MOON, S.; YEOM, D.J.; CHUNG, S.H. Neurotrophic Corneal Ulcer Development Following Cataract Surgery with a Limbal Relaxing Incision. **Korean Journal of Ophthalmology**, v. 25, n. 3, p. 210-213, 2011.

MORALES, A.; BARROS, P.S.M.; BARNIERI NETO, J.; CHIERICE, G.; CLARO NETO, S.; MIGLIATI, E.R. Experimental use of a castor bean (*Ricinus communis* L.) oil derived polymer on lamellar, interlamellar and penetrating implants in rabbit's

- cornea. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.1, p. 31-37, 2005.
- MUCCIOLI, C.; CAMPOS, M.; COLDCHMIT, M.; DANTAS, P.E.C.; BECHARA, S.J.; COSTA, V.P. A córnea não é um pedaço de plástico. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, n. 5, p. 629-30, 2006.
- MULLER, L.J.; PELS, E.; VRENSSEN, G.F. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. **British Journal of Ophthalmology**, v. 85, n. 4, p. 437-443, 2001.
- MYUNG, D.; DUHAMEL, P.E.; COCHRAN, J.R.; NOOLANDI, J.; TA, C.N.; FRANK, C.W. Development of hydrogel-based keratoprotheses: a materials perspective. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 3, p. 735-41, 2008.
- NATU, M.V.; GASPAR, M.N.; RIBEIRO, C.A.; CORREIA, I.J.; SILVA, D.; SOUSA, H.C.; GIL, M.H. A poly(ϵ -caprolactone) device for sustained release of an anti-glaucoma drug. **Biomedical Materials**, v. 6, n. 2, p. 1-9, 2011.
- NOVAES, JR.; A.B. NOVAES, A.B.; GRISI, M.F.M.; SOARES, U.N.; GABARRA, F. Gengiflex, an alkal cellulose membrane for GTR: histologic observations. **Brazilian Dental Journal**, v.4, n.2, p.65-71, 1993.
- ORÉFICE, R.L. Materiais poliméricos – Ciência e aplicações como biomateriais .In: ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais; fundamentos e aplicações**. Cultura Médica, Rio de Janeiro, p. 83-156, 2006.
- PFISTER, R.R. The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit: a scanning electron microscope study. **Investigative Ophthalmology**, v. 14, n. 9, p. 648-661, 1975.
- PIPPI, N.L.; SAMPAIO, A.J.S.A. Estudos preliminares sobre o comportamento da ceratoplastia lamelar em coelhos. **Ciência Rural**, v. 20, n. 3-4, p. 297-302, 1990.
- POK, S.W.; WALLACE, K.N.; MADIHALLY, S.V. In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 1061–1068, 2010.
- PONTES, K.C.S.; BORGES, A.P.B.; ELEOTÉRIO, R.B.; REIS, E.C.C.; DUARTE, T.S. Preserved xenogenic amniotic membrane as a patch on the repair of superficial corneal ulcers in rabbits. **Ceres**, v. 59, n.3, p. 313-320, 2012.
- PONTES, K.C.S. **Membrana amniótica xenógena, associada ou não ao n-butil 2-cianoacrilato, no tratamento de lesão corneal perfurada. Estudo experimental em coelhos**. 2010. Tese (doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Viçosa-MG, p. 76.
- PONTES, K.C.S.; BORGES, A.P.B.; ELEOTÉRIO, R.B.; FAVARATO, L.S.C.; DUARTE, T.S.; Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. **Ciência Rural**, v.41, n.12, p.2120-2127, 2011.
- QAZI, Y.; WONGA, G.; MONSONA, B.; STRINGHAMB, J.; AMBATIA, B.K. Corneal transparency: Genesis, maintenance and dysfunction. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 2-3, p. 198–210, 2010.

- REBELLO, C.; ALMEIDA, D.A.; LIMA JR., E.M.; DORNELAS, M.P. Biofill um novo substituto de pele. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v.77, n.6, p.407-414, 1987.
- REDDY, S.; SANTANAM, N.; REDDY, P.P.; ROCK, J.A.; MURPHY, A.A.; PARTHASARATHY, S. Interaction of Interceed oxidized regenerated cellulose with macrophages: A potential mechanism by which Interceed may prevent adhesions. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 167, n. 6, p. 1315-20, 1997.
- RUBERTI, J.W.; ROY, A.S.; ROBERTS, C.J. Corneal Biomechanics and Biomaterials. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 13, p. 269-95, 2011.
- SARASAM, A. e MADIHALLY, S.V. Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5500–5508, 2005.
- SAXENA, I.M. e BROWN JR., M.R. Biochemistry and Molecular Biology of Cellulose Biosynthesis in Plants: Prospects for Genetic Engineering. **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 135-160, 2008.
- SCHULZ, D.; ILIEV, M.E.; FRUEH, B.E.; GOLDBLUM, D. In vivo pachymetry in normal eyes of rats, mice and rabbits with the optical low coherence reflectometer. **Vision Research**, v. 43, n. 6, p. 723–728, 2003.
- SCHWARTZKOPFF, J.; BREDOW, L.; MAHLENBREY, S.; BOEHRINGER, D.; REINHARD, T. Regeneration of corneal endothelium following complete endothelial cell loss in rat keratoplasty. *Molecular Vision*, v. 16, p. 2368-2375, 2010.
- SHEARDOWN, H. e GRIFFITH, M. Regenerative Medicine in the Cornea. *In*; ATALA, A.; LANZA, L.; THOMSON, J.; NEREM, R. **Principles of Regenerative Medicine**, 3 ed., Elsevier, p. 1060-1071, 2008.
- SILVA, E.C.; BORGES, A.P.B.; NEVES, C.D.; CARLO, E.C.; BARROS, R.E.; HAGE, M.C.F.N.S.; SOUZA, R.L.; SOUZA, M.A.; BARUD, H.S.; BICALHO, S.M.C.M. Utilização experimental de hidroxiapatita sintética em alvéolos dentários de gatos domésticos (*Felis catus*): estudo clínico, radiográfico e histomorfométrico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 873-880, 2012.
- SINGH, S.; WU, B.M.; DUNN, J.C.Y. The enhancement of VEGF-mediated angiogenesis by polycaprolactone scaffolds with surface cross-linked heparin. **Biomaterials**, v. 32, n. 8, p. 2059-2069, 2011.
- SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3 ed. São Paulo, Rocca Ltda, p. 283-310, 2005.
- SOARES, G.A. **Biomateriais**. *In*: Fórum de Biotecnologia Biomateriais, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2005. Disponível em: http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr10_biomateriais.pdf. Acessado em: 20/05/2012.
- SOSA, A.B.; EPSTEIN S.P.; ASBELL P.A. Evaluation of toxicity of commercial ophthalmic fluoroquinolone antibiotics as assessed on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. **Cornea**, v. 27, n. 8, p. 930-934, 2008.

SUTPHIN J. Indications and contraindications for penetrating keratoplasty. In: Brightbill F, ed. **Corneal surgery: theory, technique & tissue**. 3 ed. St Louis, MO: Mosby, p. 247–258, 1999.

SUN, H.; MEI, L.; SONG, C.; CUI, X.; WANG, P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, v. 27, n.9, p. 1735–1740, 2006.

SWEENEY, F.D.; XIE, R.Z.; O'LEARY, D.J.; VANNAS, A.; ODELL, R.; SCHINDHELM, K.; CHENG, H.Y.; STEELE, J.G.; HOLDEN, B.A. Nutritional requirements of the corneal epithelium and anterior stroma: clinical findings. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 39, n. 2, p. 284-291, 1998.

SWISSA, M.; ALONI, Y.; WEINHOUSE, H.; BENIZMAN, M. Intermediary steps in acetobacter xylinum cellulosesynthesis: studies with whole cells and cell-free preparations of the wild type and a celluloseless mutant. **Journal of Bacteriology**, v. 134, n. 3, p. 1142-1150, 1980.

TANURE, M.A.G. O uso de biomateriais na córnea. In: ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais; fundamentos e aplicações**. Cultura Médica, p. 385-391, Rio de Janeiro, 2006.

TORRES, R.M.; MERAYO-LLOVES, J.; JARAMILLO M.A.; GALVIS, V. Biomecánica de la córnea. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v.80, n.4, p. 215-223, 2005

TSVETKOV, A.L.; TERESHCHENKOVA, T.F. Surgical rehabilitation of a patient with corneal perforation in keratoconjunctivitis sicca syndrome. **Vestnik Oftalmologii**. v. 117, n. 1, p. 48-49, 2001.

U.S. CONGRESS, Office of Technology Assessment. **Biopolymers: Making Materials Nature's Way** - Background Paper, OTA-BP-E-102 (Washington, DC: U.S. Government Printing Office, September 1993), p. 88.

VAN HORN, D.L.; SENDELE, D.D.; SEIDEMAN, S.; BUCO, P.J. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 16, n. 7, p. 597-613, 1977.

VANDAMME, E.J.; DE BAETS, S.; VANBAELEN, A.; JORIS, K.; DE WULF, P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 2-3, p. 93-99, 1998.

WHITCHER, J.P.; SRINIVASAN, M.; UPADHYAY, M.P. Corneal blindness: a global perspective. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 3, p. 214-221, 2001.

WILKS, E.S. Polymer nomenclature: the controversy between source-based and structure-based representations (a personal perspective). **Progress in Polymer Science**. v. 25, n. 1, p. 9-100, 2000.

WILLIAMS, J.M.; ADEWUNMI, A.; SCHEK, R.M.; FLANAGAN, C.L.; KREBSBACH, P.H.; FEINBERG, E.S.; HOLLISTER, S.J.; DAS, S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4817-4827, 2005.

WIPPERMANN, J.; SCHUMANN, D.; KLEMM, D.; KOSMEHL, H.; SALEHI-GELANI, S.; WAHLERS, T. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. **European Journal of Vascular & Endovascular Surgery**, v. 37, n.5, p. 592-596, 2009.

WU, X.Y.; TSUK, A.; LEIBOWITZ, H.M.; RANDALL, V.T. In vivo comparison of three different porous materials intended for use in a keratoprosthesis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 82, n. 5, p. 569–576, 1998.

XIA, L.; ZHANG, Z.; ZHOU, J.; LI, Y. A crucial role for B and T lymphocyte attenuator in preventing the development of CD4+ T cell-mediated herpetic stromal keratitis. **Molecular Vision**, v. 16, p. 2071-2083, 2010.

YADAV, V.; PANILIATIS, B.J.; SHI, H.; LEE, K.; CEBE, P.; KAPLAN, D.L. Novel *in vivo*-degradable cellulose-chitin copolymer from metabolically engineered *gluconacetobacter xylinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6257–6265, 2010.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA. The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244-51, 1997.

YANG, S.; LEONG, K.F.; DU, Z.; CHUA, C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 6, p. 679-89, 2001.

ZENG, Y.; YANG, J.; HUANG, K.; LEE, Z.; LEE, X. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. **Journal of Biomechanics**, v. 34, n. 4, p. 533–537, 2001.

ZERBE, B.L.; BELIN, M.W.; CIOLINO, J.B. Results from the multicenter boston type 1 keratoprosthesis study. **Ophthalmology**, v. 113, n. 10, p. 1779.e1-7, 2006.

CAPÍTULO II

Optically transparent membrane based on bacterial cellulose/polycaprolactone

H. S. Barud ^a, C. L. P. Carone ^b, P. V. S. Queiroz ^c, A. P. B. Borges ^c, V. D. Jahno ^d, R. Ligabue ^b, Sandra Einloft ^b, S. J. L. Ribeiro ^{a*}.

^a *Institute of Chemistry, São Paulo State University - UNESP, P.Box 355, Araraquara, SP –14801-970, Brazil.*

^b *LOR - Laboratório de Organometálicos e Resinas – PUC-RS, Porto Alegre, RS, Brazil.*

^c *Department of Veterinary, Federal University of Viçosa – UFV, Viçosa, MG, Brazil.*

^d *Institute of Exact Sciences and Technology - FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brazil.*

Keywords: *Bacterial cellulose; Polycaprolactone; Transparent membrane.*

ABSTRACT

Optically transparent bacterial cellulose (BC)/polycaprolactone (PCL) membrane has been prepared by impregnation of PCL acetone solution into dried BC membrane. UV-Vis measurements showed an increase on transparency in BC/PCL membrane when compared with pristine BC. The good transparency of the BC/PCL can be related to the presence of BC nanofibers associated with deposit of PCL nano-sized spherulite which are smaller than wavelength of visible range and practically free of light scattering. XRD results show that cellulose type I structure is preserved inside of the BC/PCL membrane and mechanical properties suggested that PCL is acting as a plasticizer for BC membrane. The novel BC /PCL membrane could be used for preparation of fully biocompatible flexible display and biodegradable food packaging.

Introduction

In the last years bacterial cellulose (BC)-based materials have been largely investigated aiming the utilization in opto-electronic devices [1-3]. The main applications of these novel materials include BC membranes as substrates for flexible organic lighting emission (FOLED) [4], optically transparent BC-composites [5] and matrix for electronic papers [6].

Bacterial cellulose membranes are produced by *Gluconacetobacter xylinus* strain in carbohydrate rich culture medium. The obtained BC hydrogels presents 3-D cellulose network nanofiber, high crystallinity (60-90%), high mechanical strength and full biocompatibility [7]. Cellulose nanofibers are considered highly effective reinforcements to produce high-performance optically composites that have mechanical properties similar to those of metals [1]. In fact, BC nanofibers are practically free of light scattering, showing also small thermal expansion coefficient, which is an important property for fillers in optoelectronic devices [1-2].

Recent efforts have been devoted in the preparation of optically transparent BC composites associated with other biodegradable polymers. Transparent biocompatible nanocomposite was prepared by adding bacterial cellulose membrane into poly (L-lactic acid) (PLLA) matrix [8].

New transparent nanocomposites based on different chitosan matrices and bacterial cellulose were prepared by a fully green procedure by casting a water based suspension of chitosan and bacterial cellulose nanofibrils. The BC-chitosan composites were highly transparent, flexible and displayed better mechanical properties than the corresponding unfilled chitosan films [9].

A biocompatible polymeric composite PHB/BC was prepared by incorporating bacterial cellulose (BC) into poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) matrix. The transparency of the PHB/BC nanocomposite was higher than pure BC membrane. BC also improved the thermal stability of PHB in the nanocomposite film [10].

Bacterial cellulose–poly (vinyl alcohol) nanocomposites were prepared by an *in-situ* process. The addition of a small amount of PVA turned the BC membranes in an optical transparent material with excellent mechanical properties [11].

Polycaprolactone (PCL) is a hydrophobic, semi-crystalline polymer; its crystallinity tends to decrease with the increase of the molecular weight. The good solubility of PCL in organic solvents, its low melting point (59–64°C) and the exceptional blend-compatibility has stimulated an extensive research of the potential application of this material in the biomedical field [12].

The goal of this work was the preparation and characterization of a new optically transparent membrane based on dried bacterial cellulose and polycaprolactone (PCL).

Experimental section

Bacterial cellulose was prepared according to a method described recently [13]. Polycaprolactone diol (MM= 2000, Aldrich) was used as received. The dried BC membranes (6x6 cm², 12 µm thick) were previously swollen for 48 hours in acetone. Acetone-swollen BC membrane was soaked in 25 mL of 3% (w/v) PCL acetone solution during 72 hours. After this, BC/PCL membranes were washed several times with acetone to remove the excess of PCL. They were dried at 40°C for 12 hours in Teflon plates. The PCL content in the nanocomposite was 12.0 % (w/w), determined by gravimetric measurements. Scanning electron microscopy (SEM) images were obtained in a Field Emission Scanning Electron Microscope JEOL JSM – 7500F. Samples were coated with tick carbon layer. XRD patterns were obtained in a Siemens Kristalloflex diffractometer using nickel filtered Cu K α radiation, step pass of 0.02° and a step time of 3 s, from 4 to 50° (2 θ angle). Thermal degradation analysis was performed using a Q600 SDT (TA Instruments). The samples were heated from 25-600°C of temperature with open platinum pans under dynamic nitrogen atmosphere and at heating rate of 20°C min⁻¹. The mechanical measurements were performed with a Dynamic Mechanical Analyzer (DMA) Q 800 (TA Instruments) equipped with a film tension clamp at a temperature of 27 °C. The specimens were cut in dimensions of 5.50 mm x 6.20 mm x 0.02 mm (length x width x thickness). The device was previously calibrated and a total of 4 measurements for each sample were made in order to ensure the reproducibility of the results.

Results and discussion

The **Fig. 2.1A** shows the optical transmission spectra for pristine BC membrane and BC/PCL biocomposite. Pure PCL material not forms stable films.

Pristine BC membrane is a semi-transparent material (**Fig. 2.1B**) presenting an average transmittance at 550 nm of around 65% (**Fig. 2.1Aa**) [4]. The light transmittance of BC/PCL membrane (**Fig. 2.1C**) is 84% at 550 nm (**Fig 2.1Ab**). The high transmittance is due primarily to the lateral size of the reinforcing elements; the light scattering is avoided by BC nanofibers which are smaller than the wavelength of light [1]. This increase on the transparency in the visible range of the electromagnetic spectrum is an important characteristic for the fabrication of flexible OLEDs [1-4].

SEM image of the BC membrane surface, **Fig. 2.2a**, reveals a 3-D fibrillar organization consisting of an ultrafine cellulose nanofibers network named “nanocelluloses”. The micrographs of the surface of BC/PCL membrane, **Fig. 2.2b**

show BC microfibrils covered by PCL, resulting in a smooth surface morphology, suggesting a good interaction between the two phases.

The cross-section image of pristine BC is shown in **Fig. 2.2c**. A plate-like material is clearly observed with numerous sheets forming a network of nanofibrils. SEM images for BC/PCL, **Fig. 2.2d** suggest that PCL molecules completely filled the porous between BC microfibrils. The image reveals that PCL is deposited as nano-sized spherulites. The improved transparency of the membranes can be associated with two aspects, the first one is due to the presence of BC nanofibers, as discussed above and the other aspect refers to the presence of PCL like nano-sized spherulite, which are smaller than the wavelength of visible range [10].

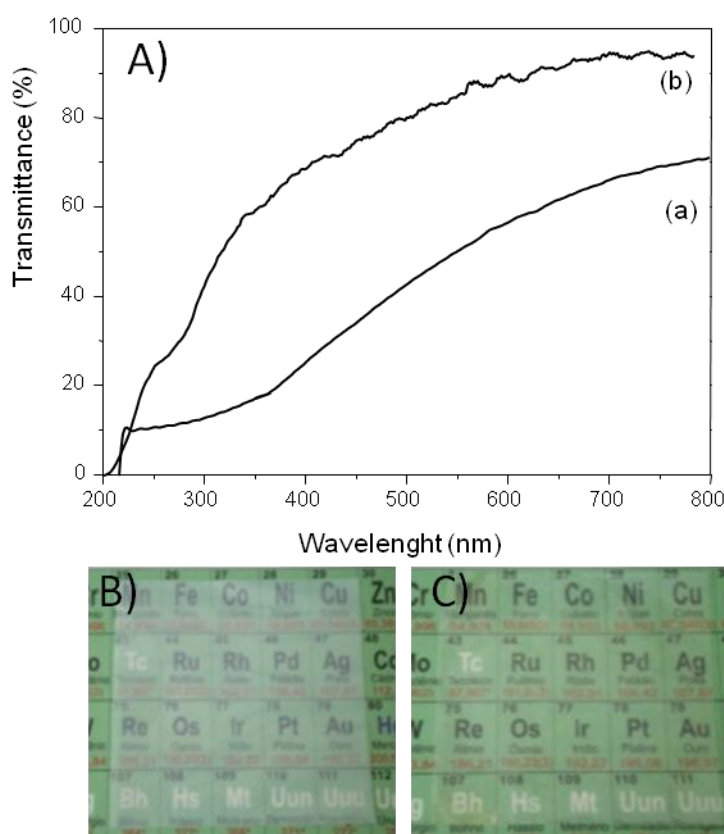


Fig. 2.1. Transparency analysis of BC and BC/PCL membranes. **A)** Ultraviolet–visible spectroscopy of: (a) BC membrane, (b) BC/PCL membrane. **B)** image of a pure BC membrane. **C)** image of a transparent BC/PCL membrane.

Analysing the XRD patterns, it was possible to observe a broad diffraction peaks at 15° and 22.5° for the pure BC membrane, **Fig. 2.3a**, which are typical of cellulose type I. These peaks are assigned to the characteristic interplane distances of cellulose 1_α and 1_β phases [14]. The diffraction pattern obtained for the PCL is characteristic of the

semi-crystalline polymer with two diffraction peaks, around 21.5 and 23.5 degrees. Moreover, the peaks were sharp and indicated that the samples were highly crystalline materials [15]. Cellulose type I patterns were observed for BC/PCL membrane, **Fig. 2.3c**, confirming that BC structure is preserved during preparation. Meanwhile, a difference can be observed in the relative intensity of the BC peaks, suggesting a change in the orientation of the cellulose fibres in the presence of PCL [11].

The Thermogravimetry (TGA) curve obtained for pure BC membrane (**Fig. 2.4a**) shows two events of weight loss. The first gradual one involving 5% of mass loss occurred from room temperature up to 150°C and can be associated with water loss of the BC surface; the second one, observed with maxima temperature at 374°C, is attributed to BC pyrolysis [10]. TG curve for PCL (**Fig. 2.4b**) shows only one weight loss event starting at around 260°C up to 490°C, with maxima temperature near to 400°C. This event occurs due to the thermal decomposition of PCL [15].

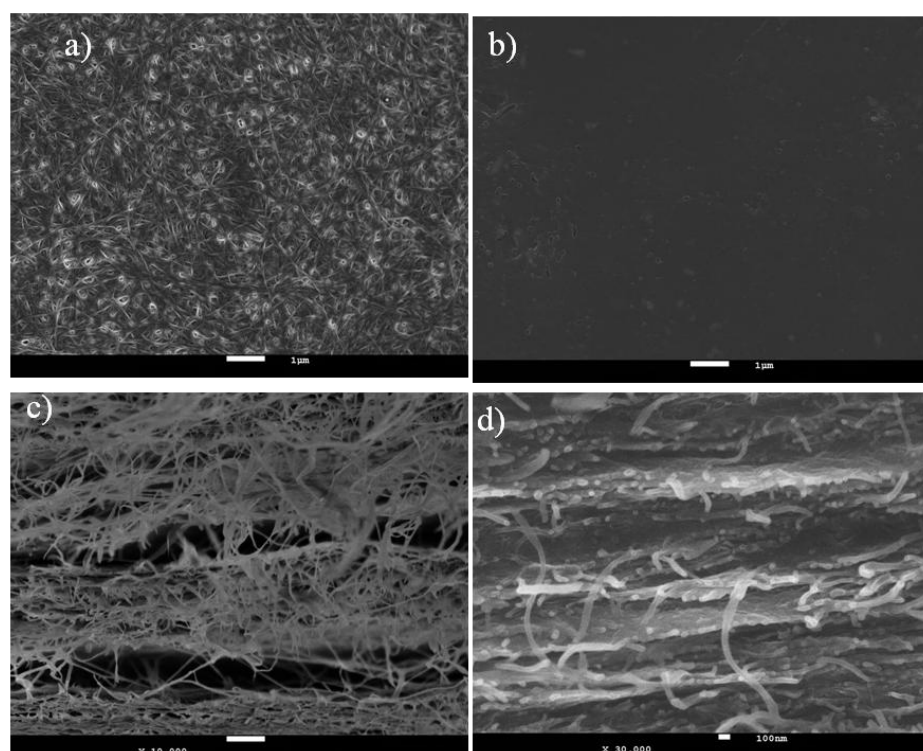


Fig. 2.2. Scanning electron microscope images of BC and BC/PCL: a) BC membrane surface, b) BC/PCL membrane surface, c) Cross-section image of BC membrane and d) Cross-section image of BC/PCL membrane.

The TGA curve for BC/PCL membrane (**Fig. 2.4c**) presents a thermal behavior close to pure BC membrane. A small and continuous mass loss event (around 3%) is observed from room temperature up to 150°C. Comparing with pure BC membrane a

slight decrease (around 10 degrees) on thermal degradation of the BC/PCL membrane was observed. Probably, the presence of PCL nanosized particles may be promoting a breakdown in the hydrogen bonds between cellulose chains.

The PCL spherulite-nanosized in the BC/PCL membrane induced a decrease on the tensile strength (112 ± 7.0 MPa) and Young's Modulus (3.6 ± 0.8 GPa) as compared a pure BC membrane, tensile strength (124 ± 8.1 MPa) and Young's Modulus (16.4 ± 2.3 GPa). In the same way, it was observed an increase on the elongation at break for BC/PCL (5.4 ± 0.5 GPa) as compared with the pure BC membrane (1.1 ± 0.3 GPa). The PCL spherulite-nanosized could increase the mobility of the cellulose chains, acting as a plasticizer for BC membrane. The increase in this property is an important feature for preparation of fully biocompatible flexible display and biodegradable food packaging.

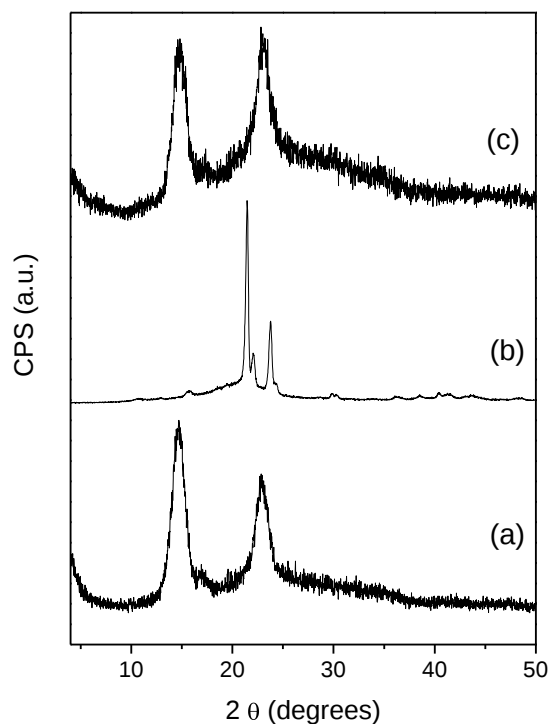


Fig. 2.3. X-ray diffraction analyses: (a) BC membrane; (b) PCL powder; (c) BC/PCL membrane.

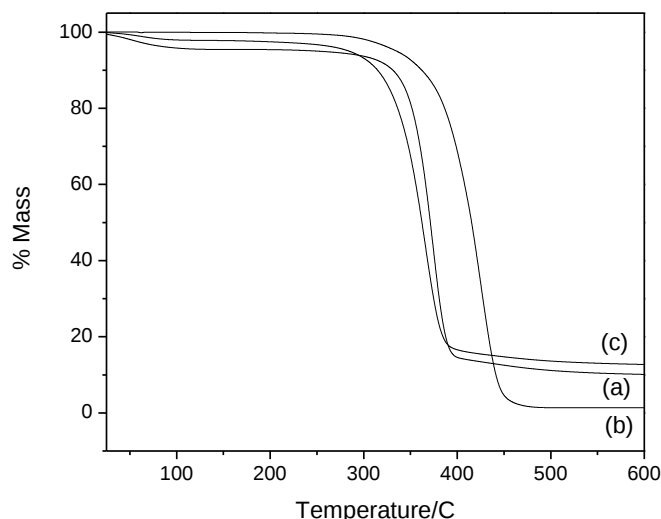


Fig. 2.4. Thermogravimetry curves for: a) BC membrane, b) PCL powder and c) BC/PCL membrane.

Conclusions

Novel optically transparent membrane based on bacterial cellulose (BC) and polycaprolactone (PCL) has been prepared by impregnation of PCL acetone solution into dried BC membrane. UV-Vis measurements showed an increase on transparency in BC/PCL membrane when compared to pristine BC membrane. The good transparency quality of the biocomposites can be associated with the presence of BC nanofibers, and principally due to the deposited of PCL nano-sized spherulites which are smaller than wavelength of visible range.

Acknowledgments

The authors acknowledge Brazilian agencies CNPq, CAPES, FAPESP, FAPERGS, PRONEX/FAPERGS/CNPq and FINEP for financial support. We would like to thank the LMA-IQ for FEG-SEM facilities.

References

- [1] A.N. NAKAGAITO, M. NOGI, H. Yano, Displays from transparent films of natural nanofibers. **MRS Bull.**, 35, p. 214 (2010).
- [2] M. NOGI, H. YANO, Transparent nanocomposites based on cellulose produced by bacteria offer potential innovation in the electronics device industry. **Adv. Mater.**, 20, p. 1849 (2008).
- [3] S. UMMARTYOTINA, J.JUNTAROB, M. SAINB, H. MANUSPIYA, Development of transparent bacterial ellulose nanocomposite film as substrate for

- flexible organic light emitting diode (OLED) display. **Ind. Crop. Prod.**, 35, p. 92 (2012).
- [4] C. LEGNANI, C. VILANI, V.L. CALIL, H.S. BARUD, W.G. QUIRINO, C.A. Achete, S.J.L. Ribeiro, M. Cremona, Bacterial cellulose membrane as flexible substrate for organic light emitting devices, **Thin Solid Films**, 517, p. 1016–1020 (2008).
- [5] M. NOGI, K. HANDA, A.N. NAKAGAITO, H. Yano, Optically transparent bionanofiber composites with low sensitivity to refractive index of the polymer matrix, **Appl. Phys. Lett.**, 87, p. 243110 (2005).
- [6] J. SHAH, JR. R.M. BROWN, Towards electronic paper displays made from microbial cellulose, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 66, p. 352 (2005).
- [7] D.J.GARDNER, G.S. OPORTO, R. MILLS, M.A.S. AZIZI SAMIR, Adhesion and surface issues in cellulose and nanocellulose, **J. Adhes. Sci. Tech.**, 22, p. 545 (2008).
- [8] Y. KIM, R. JUNG, H.S. KIM, H.J. JIN, Transparent nanocomposites prepared by incorporating microbial nanofibrils into poly (L-lactic acid), **Curr. Appl. Phys.**, 70, p. 1148 (2008).
- [9] S.C.M. FERNANDES, L. OLIVEIRA, C.S.R. FREIRE, A.J.D. SILVESTRE, C.P. NETO, A. GANDINI, J. DESBRIÉRES, Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose, **Green. Chem.**, 11, p. 2023 (2009).
- [10] C. ZHIJIANG, Y. GUANG, Optical nanocomposites prepared by incorporating bacterial cellulose nanofibrils into poly(3-hydroxybutyrate), **Mater. Lett.**, 65, p. 182 (2011).
- [11] S. GEA, E. BILOTTI, C.T. REYNOLDS, N. SOYKEABKEAW, T. PEIJS, Bacterial cellulose–poly(vinyl alcohol) nanocomposites prepared by an in-situ process, **Mater. Lett.**, 64, p. 901 (2010).
- [12] M. LABET AND W. THIELEMANS, Synthesis of polycaprolactone: a review, **Chem. Soc. Rev.**, 38, p. 3484 (2009).
- [13] J.M.A CAIUT, H.S. BARUD, M.V. SANTOS, J. MENEZES, Y. MESSADDEQ, S.J.L. RIBEIRO, Luminescent multifunctional biocellulose membranes, **Proceedings – SPIE**, 8104 (2011) 81040Z-1 - 81040Z-9.
- [14] M. WADA AND T. OKANO, Localization of Ia and Ib phases in algal cellulose revealed by acid treatments, **Cellulose**, 8, v. 183 (2001).
- [15] A.V. MACHADO, G. BOTELHO, M.M. SILVA, I.C. NEVES, A.M. FONSECA, Stability of nanocomposites of poly(ϵ -caprolactone) with tungsten trioxide, **J. Polym. Res.** 18, p. 1743 (2011).

CAPÍTULO III

Estudo *in vivo* utilizando membranas de celulose bacteriana e do nanocompósito celulose bacteriana/policaprolactona como substitutos teciduais em córneas de coelhos

Resumo

Cada vez mais os pesquisadores têm buscado nos biomateriais, substitutos ao tecido corneal. Os biopolímeros, devido a grande variedade de características físico-químicas, são promissores para cumprir esse papel. Objetivou-se neste trabalho testar o desempenho do nanocompósito celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL) e da celulose bacteriana pura (CB), como substitutos teciduais em córneas de coelhos. Para tal, foram utilizadas 36 coelhas, divididas aleatoriamente em três grupos de igual número. Em cada animal foi criada uma úlcera superficial na córnea direita com 5 mm de diâmetro e 0,2 mm de profundidade. Em seguida, foi criado um bolso interlamelar a partir da base da úlcera, para a implantação do biomaterial de acordo com o grupo experimental. Um grupo recebeu a membrana do compósito CB/PCL, outro grupo recebeu a membrana da CB pura, ambas com 8 mm de diâmetro. O último grupo não recebeu tratamento, sendo utilizado como controle. Os animais foram acompanhados até os 45 dias após as cirurgias, procedendo-se avaliações clínicas diárias nas duas primeiras semanas e a cada 48 horas nas semanas seguintes, observando-se os sinais de dor e inflamação. Três animais de cada grupo foram eutanasiados aos três, sete, 21 e 45 dias da cirurgia. Após enucleação dos olhos operados, foram colhidas amostras das córneas para análises histológicas (HE e *Picrosirius*) e para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados clínicos demonstraram moderada inflamação que começou a diminuir aos 20 dias nos grupos implantados. Já nos animais do grupo controle, a resposta inflamatória clínica se resolveu até o dia 10 após a cirurgia. Os resultados das análises histológicas demonstraram fibroplasia próxima aos implantes, infiltrado inflamatório linfo-histiocitário com células gigantes, predominância do colágeno tipo III e desorganização do colágeno em ambos os grupos com implantes ao final dos 45 dias. Não houve epitelização sobre as membranas. No grupo controle, o infiltrado inflamatório desapareceu até os 21 dias, houve completa epitelização e, ao final dos 45 dias foi observada equivalência entre os colágenos tipo I e III e organização das fibras. As imagens obtidas pela MEV demonstraram presença de células e de matriz

extracelular aderidas à superfície das membranas. Apesar da resposta inflamatória leve a moderada e dos sinais de biocompatibilidade, houve resposta inflamatória crônica e não houve epitelização nos animais implantados. Com base nesses resultados, acredita-se que os implantes de CB/PCL e CB, da maneira que foram desenvolvidos, não são adequados para substituir o tecido corneal de coelhos.

Palavras chave: úlcera de córnea, substituto tecidual, policaprolactona, biomateriais.

In vivo study using bacterial cellulose and bacterial cellulose/polycaprolactone composite as tissue substitutes in rabbits' cornea

Abstract

Researchers have increasingly sought for biomaterials that work as corneal tissue substitutes. Biopolymers, due to their wide range of physicochemical characteristics, are promising to fulfill this role. The objective of this work was to test the performance of the composite bacterial cellulose/polycaprolactone (CB/PCL) and pure bacterial cellulose (CB) as tissue substitutes in rabbit corneas. For this purpose, 36 rabbits were used. They were equally divided into three groups. In each animal one superficial ulcer of 5 mm diameter and 0.2 mm deep was created in the right cornea. Next, an interlayer pocket was created from the base of the ulcer for the implantation of the biomaterial according to the experimental group. One group received composite membrane of CB/PCL, the other one was treated with pure CB membranes, both with 8 mm diameter. The last group didn't receive any treatment and was used as a control. The animals were followed up to 45 days with clinical evaluations for two weeks and then every 48 hours, observing signs of pain and inflammation. Three animals from each group were euthanized at three, seven, 21 and 45 days after surgery. After enucleation, samples of the operated eye were collected and subjected to histological analysis (HE and *Picrosirius*) and scanning electron microscopy (SEM). Clinical results showed moderate inflammation that started to decrease on the twentieth day in the treated groups. The inflammatory response resolved until the tenth day in all of animals from the control group. The results of the histological analysis demonstrated absence of epithelium on the membranes, fibroplasia next to implants, lymphohistiocytic inflammatory infiltrate with giant cells, predominance of type III collagen and

disorganization in both groups with implants. No epithelization occurred on the membranes. In the control group the inflammatory infiltrate disappeared until the twentieth first day, there was complete healing of the defect, and, at the end of 45 days, equivalence between type I and III collagens and fiber organization were observe. Images obtained by SEM showed the presence of extracellular matrix and cells adhered to the surface of the membranes. Despite the mild to moderate inflammatory response and signs of biocompatibility, a chronic inflammatory response occurred and no epithelialization was observed. Based on these findings, it is believed that both CB/PCL and CB implants, in the way they were developed, are not suitable to replace rabbit corneal tissue.

Keywords: corneal ulcer, tissue substitute, polycaprolactone, biomaterials.

Introdução

A córnea é a parte anterior e transparente da túnica fibrosa, que tem como função a proteção do conteúdo interno do bulbo ocular e a refração da luz para a retina (SLATTER, 2005). Nos casos de úlcera progressiva, ou em injúrias corneais profundas com grande acometimento estrutural e perda da transparência, faz-se necessário o tratamento com ceratoplastia para recuperar a integridade corneal, evitando futuras complicações como perfuração ocular, endoftalmite e déficit visual (LAI e HSIUE, 2007). No entanto, quando a cegueira por enfermidade corneal já está instalada, faz-se necessária a substituição do tecido para devolver a refração necessária à visão. Para isso, as técnicas descritas se utilizam de tecido corneal doador ou de biomateriais (BARNHAM e ROPER-HALL, 1983; TOWNSEND *et al.*, 2008; ESPANA *et al.*, 2011).

A córnea e a câmara anterior são locais imunologicamente privilegiados, produzindo respostas imunes tolerantes e de baixa regulação (BIROS, 2008). Este fato tem permitido o uso de técnicas de ceratoplastia para recuperar a integridade e o estado refrativo da córnea utilizando-se aloenxertos sem terapia imunossupressora concomitante (GIMENEZ e FRINA, 1998; BIROS, 2008) e xenoenxertos penetrantes com imunossupressão apenas nos primeiros dias (TOWNSEND *et al.*, 2008). Outros exemplos de xenoenxertos que têm demonstrado eficácia na recuperação corneal são a membrana amniótica (BARROS *et al.*, 2005; PONTES *et al.*, 2012), a escama de sardinha (LAUS *et al.*, 2000) e a submucosa intestinal suína (BUSSIÉRES *et al.*, 2004).

Segundo Pressler (2010), os aloenxertos corneais demonstram os melhores resultados nas ceratoplastias. Porém, estes tem fonte limitada e podem não estar facilmente disponíveis. Sendo assim, os biopolímeros são cada vez mais estudados na substituição do tecido corneal para recuperar o estado refrativo adequado do olho (BARNHAM e ROPER-HALL, 1983; WU *et al.*, 1998; LAI e HSIUE, 2007; BENTLEY *et al.*, 2010; ESPANA *et al.*, 2011).

Para ser aplicado na córnea, um biomaterial deve ser transparente, permitir o crescimento epitelial na sua superfície, não deve desencadear resposta imune exagerada e deve permitir a fibroplasia e a deposição de matriz extracelular em sua interface (LLOYD *et al.*, 2001; TANURE, 2006). Trinkaus-randall e Nugent (1998) reportam que diferente de outros tecidos, não é indicada a utilização de materiais biodegradáveis na córnea, uma vez que eles não estão associados à regeneração do tecido com propriedades ópticas e mecânicas de uma córnea saudável.

A celulose bacteriana (CB) se trata de uma membrana polimérica produzida pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus* (KLEMM *et al.*, 2006). É considerada um material biocompatível (HELENIUS *et al.*, 2006), além de ser semitransparente, hidrofílica, flexível e semipermeável, características que favorecem sua aplicação na engenharia de tecidos (KLEMM *et al.*, 2001). A CB não é degradável nos tecidos animais (YADAV *et al.*, 2010), o que pode fazer dela uma base polimérica útil para integrar dispositivos para aplicações na córnea. Contudo, a CB é pouco elástica (alongamento à ruptura de $1,1 \pm 0,3$ GPa) e sua transparência é limitada, cerca de 65% de transmitância óptica (BARUD *et al.*, 2012).

Buscando-se aperfeiçoar as características ópticas e mecânicas da CB, tornando-a mais adequada para ser implantada na córnea, foi proposta a adição de policaprolactona (PCL) às membranas de CB. A PCL é um biopolímero termoplástico, biodegradável e biocompatível (SUN *et al.*, 2006; POK *et al.*, 2010), e que possui viscoelasticidade (DULING *et al.*, 2008). O compósito celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL) formou membranas mais maleáveis e com elevada transparência (85% de transmitância óptica) quando comparada com membranas da CB pura (BARUD *et al.*, 2012).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar membranas do compósito CB/PCL e da CB pura na substituição do tecido corneal, avaliando a biocompatibilidade, a integração com a córnea e a epitelização na sua superfície.

Material e métodos

A pesquisa foi realizada de acordo com as normas internacionais para experimentação animal, aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (projeto n.º 88/2011). Durante todo período experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), alimentados com cerca de 200 g diárias de ração para coelhos, feno e água à vontade.

Os biomateriais foram preparados como descrito por Barud *et al.* (2012), apresentado no capítulo II deste trabalho. As membranas de celulose bacteriana (CB) e do compósito celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL) foram cortadas para apresentarem o formato de círculo com 8 mm de diâmetro e, em seguida, foram esterilizadas por radiação gama (20 KGy) (EMBRARAD, Tecnologia em esterilização – Jarinu – SP).

Foram utilizadas 36 coelhas da raça Nova Zelândia Branca, com cinco meses de idade. No período pré-operatório os animais foram submetidos a exame oftálmico composto por teste de lacrimal de Schirmer (Teste da Lágrima de Schirmer - Ophthalmos® - São Paulo – Brasil), biomicroscopia em lâmpada de fenda (Portable Slit Lamp – Kowa, SL - 15) e teste de tingimento com fluoresceína (Fluoresceína colírio - Ophthalmos®). Os animais foram separados aleatoriamente em três grupos de 12 cada. O primeiro grupo (CB/PCL) foi tratado com o compósito celulose bacteriana/policaprolactona, o segundo (CB) com a celulose bacteriana pura e o terceiro não recebeu tratamento, sendo utilizado como grupo controle. Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos de três animais cada, para serem eutanasiados para coleta de amostras aos três, sete, 21 e 45 dias após da cirurgia.

Como recomendado por Flecknell *et al.* (2007) os animais não passaram por jejum sólido ou hídrico. Induziu-se a anestesia com quetamina/xilazina (30 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente) por via intramuscular. Após a indução, foi realizada a tricotomia na região periocular com máquina de tosa (Andis, Ranvine Wisconsin – Modelo AGC2). A córnea e a conjuntiva foram lavadas com solução fisiológica estéril. Os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo, quando foi colocada a máscara facial para manutenção anestésica, utilizando-se isoflurano diluído em 100% de oxigênio.

As cirurgias foram realizadas no olho direito, com o auxílio de microscópio cirúrgico em magnificação de 10 vezes (DF-Vasconcelus, modelo MTC, linha: MC-M2222). A antisepsia periocular foi realizada com iodopovidona a 10% e a antisepsia

da córnea e conjuntiva, com solução antisséptica de iodopovidona a 0,5% (Ophthalmos Fórmulas Oficiais LTDA – Ophthalmos®). Em seguida, duas gotas do colírio de lidocaína 4% (Ophthalmos®) foram instiladas no olho. O campo operatório foi protegido com pano fenestrado oftálmico e a blefarostase foi obtida com espéculo ocular de Barraquer. Fios de náilon 4.0 foram utilizados para a fixação do bulbo ocular nas posições de seis e 12 horas, próximo ao limbo na conjuntiva bulbar. Novas instilações de lidocaína a 4% foram feitas a cada 10 minutos até a finalização do procedimento. As córneas foram constantemente irrigadas com solução salina balanceada (SSB - Ophthalmos®).

Uma ceratectomia superficial foi realizada no centro da córnea, retirando-se um fragmento de 5,0 mm de diâmetro e 0,2 mm de espessura, com o auxílio do trépano de Castroviejo, lâmina número 15 montada em bisturi cabo número três, tesoura e pinça de córnea (Figura 3.1A-D). Após a retirada do fragmento superficial, foi criado um bolso interlamelar a partir da periferia no assoalho da ferida utilizando-se espátula de delaminação, a qual foi introduzida (Figura 3.1E) e girada em 360° separando o estroma em toda circunferência da córnea, avançando-se cerca de 3,0 mm em direção ao limbo.

As membranas do compósito celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL) e da celulose bacteriana pura (CB), anteriormente cortadas com *punch* de 8,0 mm de diâmetro foram hidratadas em solução salina balanceada (SSB) antes da implantação. Nos grupos CB/PCL e CB, a membrana foi posicionada de maneira que permitiu a inserção de sua borda no bolso interlamelar com o auxílio de um gancho tipo Nagahara e pinça de córnea tipo colibri. O implante foi movimentado na área central do assoalho da lesão até que toda a sua circunferência estivesse com as bordas homogeneamente distribuídas dentro do bolso (Figura 3.1F). No grupo controle, as cirurgias seguiram até a conclusão do bolso interlamelar, sem envolver a aplicação de qualquer implante. Todas as cirurgias foram realizadas no bloco cirúrgico experimental do Departamento de Veterinária - UFV.

Para analgesia pós-operatória foi administrado sulfato de morfina (1 mg/kg/SC) imediatamente após as cirurgias e a cada 12 horas durante dois dias. Nos primeiros três dias, os olhos operados foram limpos uma vez ao dia com solução salina estéril 0,9% e gaze. A antibioticoterapia tópica foi feita com a aplicação do colírio à base de neomicina 0,175%, polimixina B 10.000 UI e bacitracina 400 UI (Ophthalmos®) uma gota a cada quatro horas no período diurno, durante os 45 dias de acompanhamento. Para a cicloplegia foi aplicado colírio a base de atropina 0,5% (Ophthalmos®) uma vez ao dia durante 10 dias.

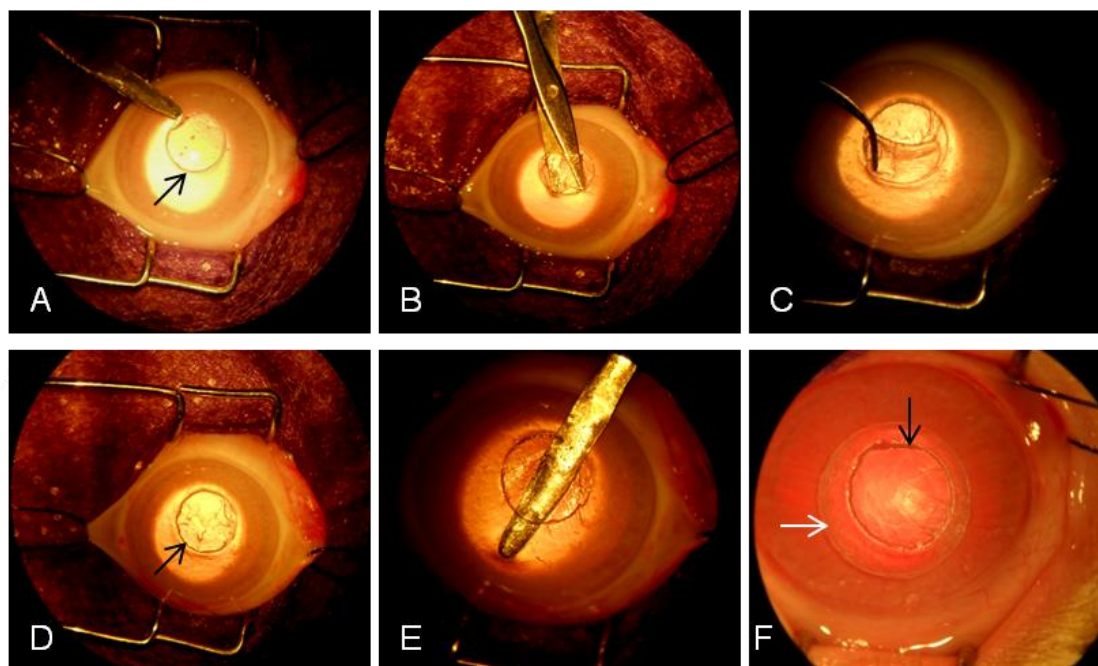


Figura 3.1. Fotografias da técnica cirúrgica para implantação das membranas do composto celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL) e da celulose bacteriana (CB) nas córneas dos coelhos. **A** - Limite da marcação da córnea com trépano (ponta da seta). **B** e **C** - Dissecção do fragmento lamelar. **D** - Ceratectomia lamelar superficial completa, indicada pela borda da trepanação (seta). **E** - Inserção intraestromal da espátula para criação do bolso. **F** - Membrana inserida no bolso interlamelar, evidenciando a borda da trepanação (seta preta) e a borda da membrana no espaço interlamelar (seta branca) (Magnificação de 10x – UFV, 2010).

A avaliação clínica foi realizada a cada 24 horas nas duas primeiras semanas, aumentando-se o intervalo para 48 horas nas semanas seguintes, até atingir os 45 dias da cirurgia. O exame clínico foi iniciado com o teste da lágrima de Schirmer. Os outros parâmetros avaliados foram o blefaroespasma, a secreção ocular e a hiperemia conjuntival através da iluminação direta, aplicando-se os graus 1 (para presente) e 0 (para ausente). Com o auxílio da magnificação de 10 vezes do biomicroscópio em lâmpada de fenda avaliou-se o edema (caracterizado pela opacidade corneal) e a hiperemia da íris, aplicando-se os graus 1 (para presente) e 0 (para ausente).

A vascularização na córnea foi observada também pela biomicroscopia e foi graduada em quatro níveis: 0 (para vasos ausentes), 1 (para até quatro vasos que não progrediam em direção ao foco da lesão), 2 (para cinco a oito vasos que avançavam em direção ao foco da lesão) e 3 (para mais de oito vasos que avançavam para o foco da lesão).

Para finalizar cada exame clínico foi feito o teste do tingimento pela fluoresceína, com a finalidade de avaliar a epitelização na área operada, graduando em 1 (para coloração positiva) e 0 (para coloração negativa).

Os animais foram submetidos à eutanásia utilizando-se sedação com acepromazina na dose de 0,1 mg/kg por via intravenosa, seguida de sobredose anestésica com tiopental sódico também por via intravenosa. Três animais de cada grupo (CB/PCL, CB e controle) foram eutanasiados aos três, sete, 21 e 45 dias após a cirurgia. Os olhos operados foram enucleados e fixados em solução de Bouin por 24 horas. Após esse tempo, os olhos foram seccionados na área central da lesão, no eixo sagital, dividindo o bulbo ocular em dois hemisférios, um para histologia e outro para microscopia eletrônica de varredura. Na sequência, as amostras foram transferidas para o álcool 70%.

Os fragmentos passaram por desidratação em concentrações crescentes de álcool (70 – 100%) e, após passarem pelo xilol foram incluídos em blocos de parafina. Para preparação das lâminas, as amostras foram cortadas na espessura de 5 µm e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliar a epiteliação na área lesionada (graduação 0 para ausente, 1 para incompleta e 2 para completa), a presença de infiltrado inflamatório, de edema inflamatório (graduação 0 para ausente, 1 para discreto, 2 para moderado e 3 para intenso), a fibroplasia na área lesionada (graduação 0 para ausente e 1 para presente) e os tipos celulares envolvidos no processo de reparação. A preparação das lâminas foi realizada no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária - UFV.

Outras amostras foram coradas com *Picrosirius* (1% de *sirus red* em solução aquosa saturada de ácido pícrico) para observar a proporção entre os colágenos tipo I e tipo III. A coloração com o *Picrosirius* foi realizada no Laboratório de Biologia Estrutural - UFV, e as fotografias com a luz polarizada (microscópio Olympus – BX50) no Laboratório de Associações Micorrízicas do BIOAGRO - UFV.

Para a realização da MEV, foram escolhidas duas amostras de cada um dos grupos (CB/PCL, CB e controle) de sete dias e de 45 dias. As amostras que foram previamente fixadas em solução de Bouin e mantidas em álcool 70%, passaram por dois diferentes processos de preparação. No primeiro processo (P1), uma das amostras de cada grupo de sete e de 45 dias foram retiradas do álcool 70% e cortadas em fragmentos, de tal maneira que foi preservada toda a espessura da córnea na área cirúrgica. No segundo processo (P2), as amostras restantes, tanto de sete quanto de 45 dias, foram retiradas do álcool 70% e passaram por banhos em concentrações crescentes de sacarose (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0M), durante 48 horas em cada concentração para, em seguida, serem congeladas em nitrogênio líquido e fraturadas.

Todas as amostras, tanto provenientes do P1 quanto do P2, passaram por desidratação em soluções crescentes de etanol. Foi conduzida a secagem em ponto crítico (Critical Point Dryer – BAL-TEC, modelo CPD 030), em seguida, os fragmentos foram montados em suportes de alumínio posicionando-se a face lateral com a espessura da córnea voltada para o campo de análise. Na sequência, as amostras foram metalizadas com ouro carpado (Metalizador Sputte Ring - Balzers – modelo FDU – 010) para serem analisadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO – modelo 1430 UP). A análise visou observar a deposição de matriz extracelular na interface dos implantes com o tecido hospedeiro, como também interfaces de adesão celular aos implantes. Todos os procedimentos relacionados à MEV foram realizados no Núcleo de Microscopia e Microanálise - UFV.

Análise dos dados

Para avaliar o efeito dos tratamentos (compósito celulose bacteriana/policaprolactona – CB/PCL, celulose bacteriana pura - CB e controle - CT) na variação dos sinais clínicos dos animais ao longo do tempo (dias), foram feitas análises de covariância (ANCOVA) para medidas repetidas, ajustando-se modelos lineares generalizados de efeito misto (GLMM – Generalized Linear Mixed Effects Models). Foram ajustados modelos para cada uma das seguintes variáveis resposta (respectiva análise e distribuição de erros, entre parênteses): quantidade de líquido lacrimal produzido (teste de Schirmer; erros normais); sinal de sensação de dor ou blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival, edema corneal, hiperemia da íris e tingimento pela fluoresceína (binomial binária); vascularização corneal (binomial, com o valor máximo de vascularização, como denominador binomial). Foi feita a simplificação dos modelos, até encontrar o Modelo Mínimo Adequado (MMA). Inicialmente foi avaliada a significância das interações pela comparação de modelos, com e sem as mesmas. As diferenças de efeito entre tratamentos foi avaliada por análise de contraste, amalgamando níveis não significativos de tratamento. Os modelos mínimos adequados foram submetidos à análise de resíduos, para avaliar a adequação do modelo e dos erros. Todas as análises estatísticas dos sinais clínicos foram realizadas com o auxílio do software R 2.13.1 (R Development Core Team 2012).

As variáveis obtidas na avaliação histológica das amostras foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo Student-Newman-Keuls, em caso de significância. Para todas as análises foi considerado $\alpha=0,05$.

Os resultados das análises histológicas com coloração pelo *Picrosirius* e das análises pela microscopia eletrônica de varredura foram apresentados de maneira descritiva.

Resultados e discussão

Avaliação clínica

O valor do teste da lágrima de Schirmer aumentou a partir do primeiro dia e se manteve elevado durante cerca de oito dias. Nos dias seguintes os valores diminuíram e voltaram ao normal em torno do dia 15 (Figura 3.2A), não apresentando diferença estatística entre os grupos ($p = 0,362$). É natural que a secreção de lágrima aumente nos primeiros dias após lesões na superfície corneal, pois como descreve Slatter (2005), a lágrima funciona como a primeira linha de defesa da superfície ocular. Assim, o aumento do fluido lacrimal levará mais células inflamatórias, anticorpos e substâncias antibacterianas para a área afetada. A posterior normalização da secreção lacrimal em todos os grupos demonstra que os implantes não interferiram na produção da lágrima ao longo do tempo.

Os sinais clínicos blefarospasmo, secreção ocular e hiperemia conjuntival aumentaram significativamente ao longo do tempo para os grupos CB/PCL e CB em relação ao grupo controle ($p<0,001$, $p<0,001$ e $p=0,038$ respectivamente), porém não houve diferença estatística entre os grupos CB/PCL e CB ($p=0,336$, $p= 0,629$ e $p=0,079$ respectivamente). Nos dois primeiros dias, a quantidade de animais que apresentaram blefarospasmo se apresentou muito pequena, tanto nos grupos tratados como no controle. Isso provavelmente pela administração da morfina nesse período. Esse sinal clínico esteve presente na maioria dos animais dos grupos CB/PCL e CB entre os dias 10 e 20, sendo resolvido até o dia 33 (Figura 3.2B). A administração da atropina pode ter contribuído, em menor proporção, para a baixa taxa de apresentação do blefarospasmo antes dos 10 dias, pois até esse tempo, os olhos operados sofreram instilações com essa droga. Quando presente no grupo controle, o blefarospasmo desapareceu até o quinto dia após a cirurgia (Figura 3.2B). Esse sinal expressa sensação dolorosa (SLATTER, 2005), e sendo observado no maior número de animais dos grupos tratados em períodos tardios, sugere que os implantes incitaram resposta

inflamatória mais prolongada, mas que se resolveu antes dos 45 dias de acompanhamento.

A secreção ocular esteve presente na maioria dos animais aos dois dias em todos os grupos, sendo completamente resolvida aos cinco dias no grupo controle, mas apresentando recidivas ao longo do tempo nos grupos CB/PCL e CB (Figura 3.2C). A hiperemia conjuntival esteve presente até o dia nove no grupo controle, o que pode ter sido resultado apenas da manipulação cirúrgica. Já nos grupos CB/PCL e CB, ela perdurou até os 21 dias da cirurgia (Figura 3.2D), reforçando assim a hipótese de que os implantes estimularam uma resposta inflamatória mais prolongada, mas que não permaneceu até o fim do acompanhamento experimental.

O edema corneal pôde ser nitidamente observado já no primeiro dia no grupo controle (Figura 3.2E), o qual foi visto até os 45 dias em menor intensidade quando comparado com os primeiros dias após as cirurgias (Figura 3.3A). No grupo CB, não foi possível observar claramente o início da opacificação, devido ao baixo nível de transparência da membrana. Já no grupo CB/PCL, o nível de transparência observado ao término da cirurgia, permaneceu até por volta do dia quarto de pós-operatório (Figura 3.3B). No entanto, quando neste último grupo foi feita a comparação clínica da opacidade na área implantada dos primeiros dias da cirurgia, em relação aos dias seguintes, notou-se opacidade mais intensa a partir do sexto dia de pós-operatório (Figura 3.2E). Esse resultado sugere que as membranas podem ter protegido a superfície ocular na ausência do epitélio, não permitindo a entrada de fluidos o que logo causaria opacificação, sendo observado apenas a opacidade tardia que segundo Qazi *et al.*, (2010) é resultado da infiltração e das mudanças celulares que ocorrem durante a cicatrização corneal, e não da alteração hídrica do estroma. Porém, não houve diferença significativa para esta variável entre os grupos ($p=1$).

A hiperemia na íris, quando presente no grupo controle, não foi mais observada a partir do quinto dia (Figura 3.2F), sugerindo que nesse grupo o sinal clínico está relacionado com o procedimento cirúrgico. Nos grupos CB/PCL e CB, a hiperemia da íris aumentou significativamente ao longo do tempo em relação ao controle ($p<0,01$). Nos dois grupos tratados, o sinal clínico se apresentou na maioria dos animais entre os dias quatro e 10 (Figura 3.3C), diminuindo nos dias seguintes até desaparecer entre os dias 29 e 37 (Figura 3.2F). Tal fato corrobora a observação de uma resposta inflamatória mais significativa provocada pelos implantes, inclusive em estruturas internas. Não houve significância para esta variável entre os grupos CB/PCL e CB ($p=0,278$). Wu *et al.* (1998) sugerem que implantes corneais sempre promoverão algum tipo de reação

inflamatória, não devendo esta ser exagerada, o que culminaria com a expulsão do biomaterial, ou promoveria o crescimento exagerado de epitélio e de tecido cicatricial. Assim sendo, os sinais clínicos de inflamação e dor nos olhos que receberam implante intracorneal de membranas do compósito CB/PCL e da CB pura, estão de acordo com a literatura.

O tingimento pela fluoresceína foi positivo até o dia quatro nos animais do grupo controle, diminuindo significativamente ao longo do tempo em relação aos grupos CB/PCL e CB ($p < 0,001$) (Figura 3.2G), os quais o tingimento pela fluoresceína foi positivo durante todo o período de acompanhamento (Figura 3.3C, D e F). Esse sinal é indicativo de que não houve completa epitelização sobre os implantes.

A ausência de epitelização nos animais implantados pode explicar o reaparecimento da secreção ocular nos animais dos grupos CB/PCL e CB. Isso se deve às características do epitélio corneal, que possui na sua superfície células pavimentosas fortemente unidas de maneira a não deixar espaços, fornecendo uma superfície plana e homogênea, que juntamente com o filme lacrimal não permitem acúmulo de detritos e de microorganismos (SHEARDOWN e GRIFFITH, 2008; QAZI *et al.*, 2010). A ausência do epitélio na área trepanada provavelmente permitiu o acúmulo de impurezas na superfície exposta da membrana, o que deu origem à secreção ocular.

A vascularização foi marcadamente mais intensa nos grupos CB/PCL e CB, com vasos surgindo a partir de toda a circunferência do limbo em alguns casos, e quase invariavelmente atingindo a área dos implantes (Figura 3.3D e E). Apresentou-se na maioria dos animais em intensidade 2 e 3 entre os dias 21 e 35, diminuindo para intensidade 2 na maioria dos animais até os 45 dias (Figura 3.2H), quando foi possível visibilizar vasos ainda ativos envolvendo os implantes (Figura 3.3F). No grupo controle, a vascularização se apresentou em intensidade 1 até os 29 dias, observando-se apenas vasos fantasmas a partir desse dia, até o final do período de 45 dias de avaliação (Figura 3.2H). Essa variável aumentou significativamente ao longo do tempo nos grupos CB/PCL e CB em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), e não houve diferença significativa entre os grupos implantados ($p = 0,073$).

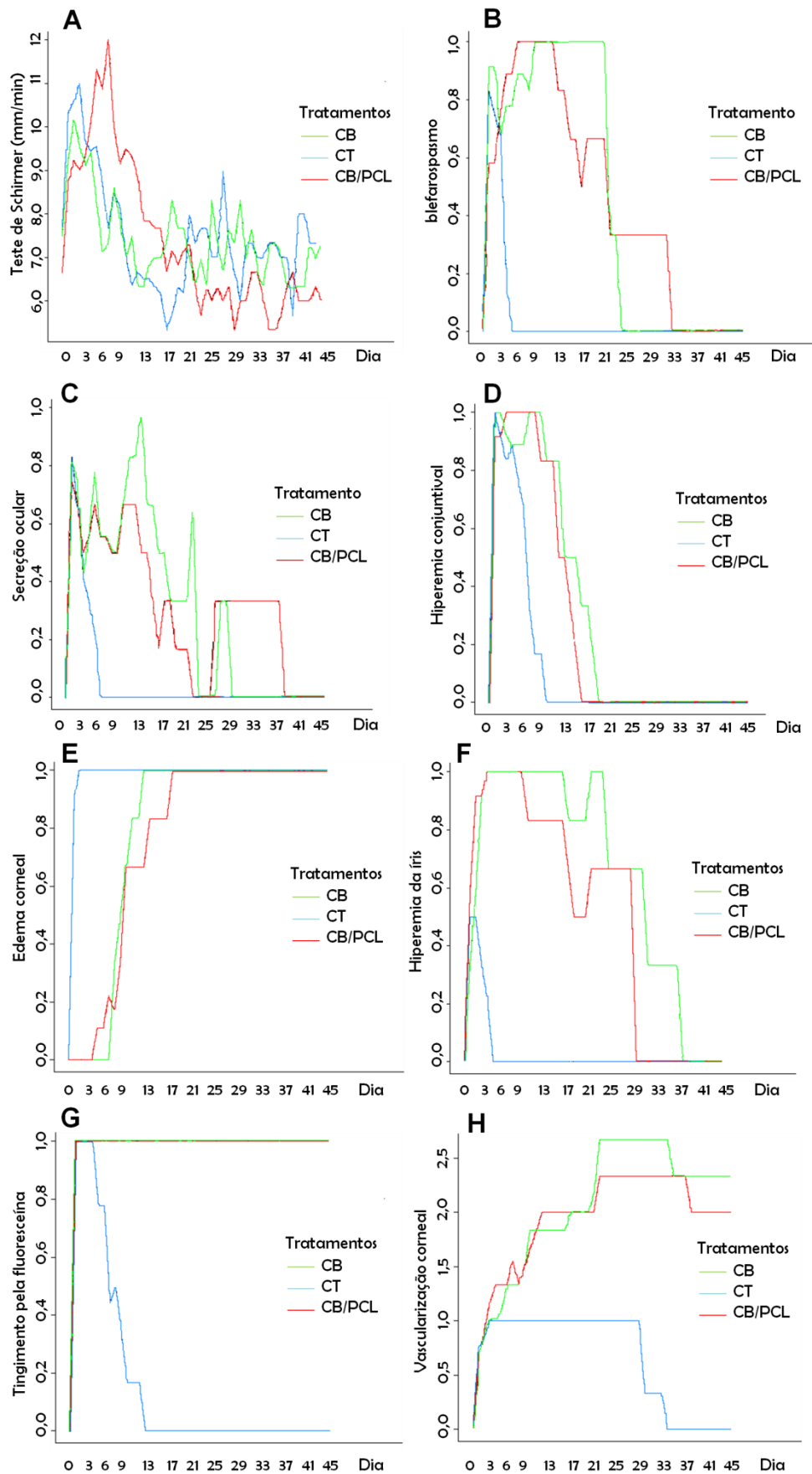


Figura 3.2. Média da apresentação dos sinais clínicos pós-operatórios avaliados ao longo do tempo. **A:** teste da lágrima de Schirmer. **B:** blefarospasmo. **C:** secreção ocular. **D:** Hiperemia conjuntival. **E:** edema corneal. **F:** hiperemia da íris. **G:** tingimento pela fluoresceína. **H:** vascularização corneal (CB – Celulose bacteriana, CT – Controle, CB/PCL – Celulose bacteriana/policaprolactona).

Segundo Ellenberg *et al.* (2010) a vascularização corneal é esperada sempre que houver lesão atingido o estroma ou as camadas mais profundas da córnea. Assim como neste trabalho, Macedo *et al.* (2010) observaram maior grau de vascularização entre 15 e 48 dias ao aplicarem a celulose bacteriana (CB) para recobrir úlceras em córneas de coelhos, encontrando-se apenas vasos fantasmas até os 60 dias de acompanhamento. Isso demonstra que a CB estimulou a vascularização corneal mesmo sendo utilizada na superfície da córnea. Wu *et al.* (1998) demonstraram a vascularização em tipos diferentes de implantes intracorneais, eles observaram invasão vascular máxima até na oitava semana de acompanhamento. Espana *et al.* (2011) encontraram vasos ativos após 24 meses da implantação do pHEMA-MMA em córneas de coelhos. Assim, o período de intensidade vascular máxima, em torno dos 35 dias após implantação da CB/PCL e da CB, está de acordo com a literatura. Por isso, a resposta vascular das córneas às membranas, pode ser enquadrada como o esperado para implantes intracorneais biocompatíveis. Assim como sugerem Fuchs *et al.* (2001), a chegada de novos vasos após a colocação de dispositivos intratecuiduais é importante para que se agilize o processo de incorporação dos implantes aos tecidos hospedeiros.

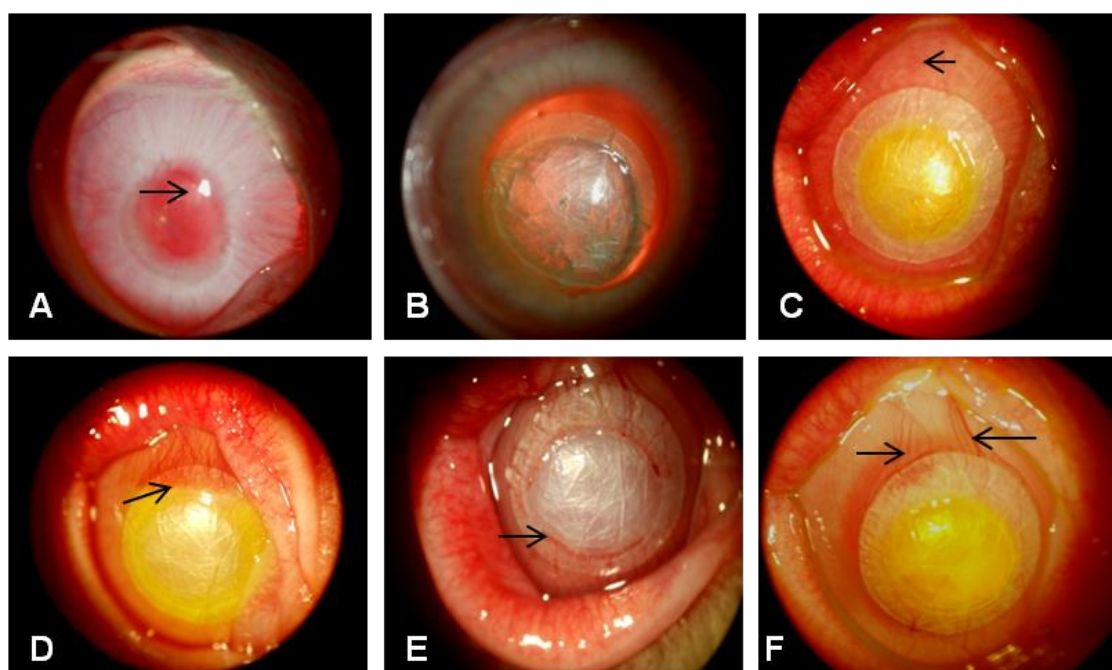


Figura 3.3. Fotografias dos aspectos clínicos do pós-cirúrgico dos animais dos grupos celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL), celulose bacteriana (CB) e controle (CT). **A** - Grupo controle com 45 dias, apresentando discreto edema corneal (seta). **B** - Grupo CB/PCL com quatro dias, mostrando elevada transparência através da membrana do compósito. **C** - Grupo CB com cinco dias, com hiperemia na íris (seta) e fluoresceína corando a área trepanada. **D** - Grupo CB aos 10 dias, com vascularização (seta) se aproximando da borda da área trepanada corada por fluoresceína. **E** - Grupo CB aos 27 dias, demonstrando a vascularização (seta) circundando a borda da área trepanada. **F** - Grupo CB aos 45 dias, onde se observa vascularização (seta) ainda ativa, com área trepanada corada por fluoresceína (Magnificação de 12x – UFV, 2012).

Nenhuma membrana se desprende do local de implantação. Quase todos os implantes se mantiveram estáveis durante o período de acompanhamento, o que sugere afinidade dos biomateriais para com o tecido. Apenas um animal do grupo CB/PCL e outro do grupo CB com 45 dias apresentaram discreta protrusão das membranas.

Avaliação histológica

A tabela 3.1 resume os aspectos histológicos dos três grupos avaliados ao longo do período pós-operatório. O teste de Kruskal-Wallis revelou que houve diferença significativa entre os grupos em todas as variáveis testadas ($p < 0,05$). Entretanto, o teste de Student-Newman-Keuls não foi capaz de identificar entre quais grupos se encontravam as diferenças.

A análise das amostras obtidas aos três dias após as cirurgias revelou discreto infiltrado neutrofílico, apoptose dos ceratócitos adjacentes à área lesionada, identificada pela ausência dessas células na região (Figura 3.4A). Também foi observado o início da proliferação epitelial a partir da borda da lesão nos três grupos (Figura 3.4B).

Aos sete dias, observou-se moderado infiltrado inflamatório neutrofílico em todos os grupos (Figura 3.5). Neste tempo, foi percebida a proliferação de fibroblastos, inclusive nas proximidades dos implantes. A epitelização foi completa no grupo controle; porém, nos grupos CB/PCL e CB, o processo não evoluiu, mantendo-se como no período anterior.

Tabela 3.1. Medianas das variáveis obtidas a partir de análises histológicas de córneas de coelhos, segundo a data de coleta e o tratamento.

Dia	Tratamento	Infiltrado Neutrofílico	Infiltrado Linfo- histiocitário	Células Gigantes	Fibroplasia	Epitelização	Edema Inflamatório
3	CB/PCL	1	0	0	0	1	0
	CB	1	0	0	0	0	0
	CT	1	0	0	0	1	0
7	CB/PCL	2	0	0	1	1	0
	CB	2	1	0	1	1	0
	CT	2	0	0	1	2	0
21	CB/PCL	1	1	1	1	1	1
	CB	1	2	1	1	1	0
	CT	0	0	0	1	2	0
45	CB/PCL	0	1	1	1	1	0
	CB	1	2	2	1	1	2
	CT	0	0	0	1	2	0

CB/PCL: Celulose bacteriana/policaprolactona, CB: Celulose bacteriana, CT: Controle. Infiltrado neutrofílico, infiltrado linfo-histiocitário, células gigantes e edema inflamatório: 0 = ausente, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = intenso. Fibroplasia: 0 = ausente, 1 = presente. Epitelização: 0 = ausente, 1 = incompleta, 2 = completa.

Quase todos os resultados obtidos aos três e aos sete dias estão de acordo com a regeneração normal da córnea descrita por Qazi *et al.* (2010). A exceção é a ausência do avanço da epitelização nos animais com implantes, dando indícios de que as superfícies dos biomateriais não favoreceram a adesão e o crescimento do epitélio.

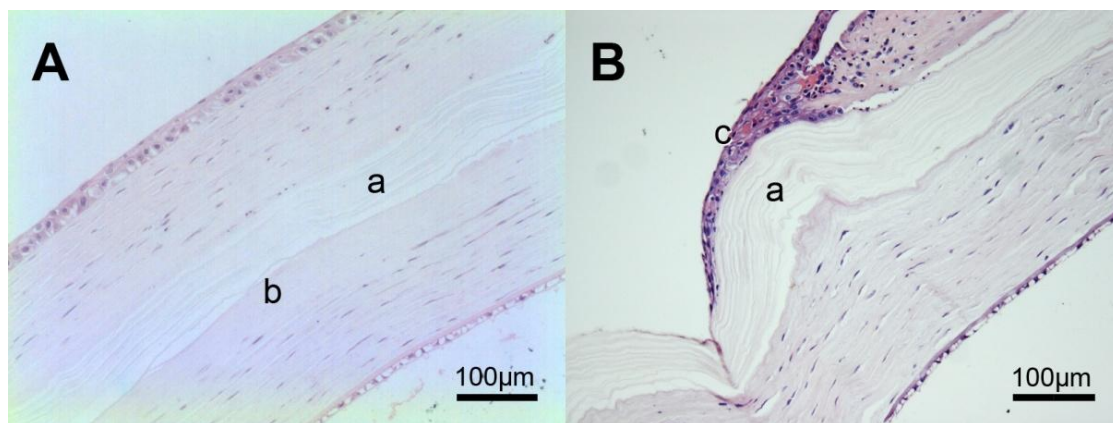


Figura 3.4. Fotomicrografia de córneas de coelhos após três dias da implantação do composto celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL). **A** – Implante na região intraestromal; **B** – Região da borda da ferida com o implante. a – Implante; b - Região com apoptose de ceratócitos; c – Epitelização (coloração HE – UFV, 2012).

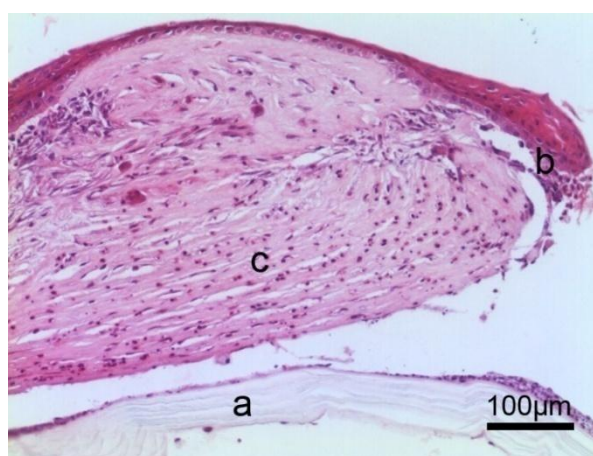


Figura 3.5. Fotomicrografia de córnea de coelhos após sete dias da implantação da membrana de celulose bacteriana (CB). Observar a região da borda da ferida com o implante no espaço intraestromal. a – Implante; b – Epitelização; c – estroma com infiltrado neutrofílico (coloração HE – UFV, 2012).

Aos 21 dias, o infiltrado inflamatório não foi observado nos animais do grupo controle. Nos grupos CB/PCL e CB foi observado infiltrado linfo-histiocitário de intensidade leve a moderada, vasos na região lesionada, fibroblastos aderidos à membrana e discreta presença de células gigantes (Figura 3.6). O infiltrado presente contendo linfócitos e histiócitos é indicativo de processo inflamatório crônico pois, como descrito por Kumar *et al.* (2008), essas células agem de maneira bidirecional,

provocando um ciclo de ativação celular contínuo que reabastece a população de células inflamatórias no local por longos períodos.

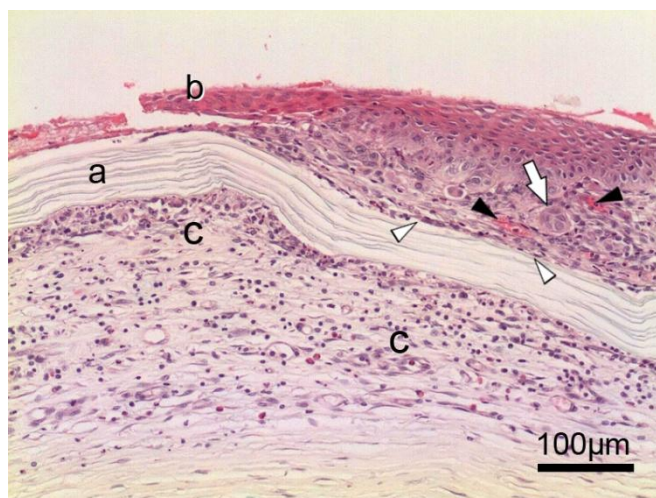


Figura 3.6. Fotomicrografia de córnea de coelho após 21 dias da implantação da celulose bacteriana (CB). Região da borda da ferida com o implante. a – Implante; b – Epitelização; c – Estroma com infiltrado linfo-histiocitário predominante; seta branca – Células gigantes; cabeça de seta branca – Fibroblastos; cabeça de seta preta – Vasos sanguíneos (coloração HE – UFV, 2012).

Quadro semelhante ao apresentado no dia 21 estava presente aos 45 dias nos grupos CB/PCL e CB, com a persistência do infiltrado linfo-histiocitário com intensidade discreta a moderada (Figura 3.7A e B). As células gigantes foram encontradas em intensidade discreta a moderada, localizando-se principalmente nas margens dos implantes (Figura 3.7C). O tipo de infiltrado inflamatório presente aos 45 dias reforça a hipótese de que os implantes estimularam uma resposta inflamatória persistente da córnea, e a presença de células gigantes localizadas nas bordas das membranas é indicativo de resposta tipo corpo estranho (KUMAR *et al.*, 2008).

Acosta *et al.* (2006) relataram que o estroma corneal em felino pode demorar meses para retomar sua completa espessura após perda tecidual, sugerindo que a regeneração corneal normalmente é lenta. Nesse contexto, Trinkaus-Randal *et al.* (1991) e Wu *et al.* (1998) demonstraram nos seus estudos para comprovar a biocompatibilidade de diferentes materiais na córnea, a presença de células inflamatórias por até 12 semanas, mas não envolvendo a presença células gigantes. Dessa forma, o processo inflamatório observado à histologia sugere que as membranas de CB/PCL e de CB não apresentaram a biocompatibilidade demonstrada por Helenius *et al.* (2006) com membranas de celulose bacteriana (CB) úmidas, implantadas em tecido subcutâneo de ratos. Eles não encontraram presença significativa de inflamação, além de terem observado boa integração do biomaterial com o tecido. Dados como esses devem ser

comparados com cautela, uma vez que os implantes foram realizados em diferentes regiões, tecido subcutâneo e córnea, que podem expressar diferentes respostas. Além disso, para o presente estudo, as membranas de CB foram secadas antes de serem preparadas para a implantação na córnea. Outras pesquisas demonstram excelente biocompatibilidade da CB úmida, como as de Klemm *et al.* (2001) e Wippermann *et al.* (2009), que aplicaram tubos de CB úmida como substitutos de segmentos vasculares *in vivo*, não sendo observada a presença de inflamação ou sinais de rejeição. Klemm *et al.* (2001) utilizaram dispositivos à base de CB úmida para recobrir anastomoses em nervos de ratos, que também não incitaram resposta inflamatória.

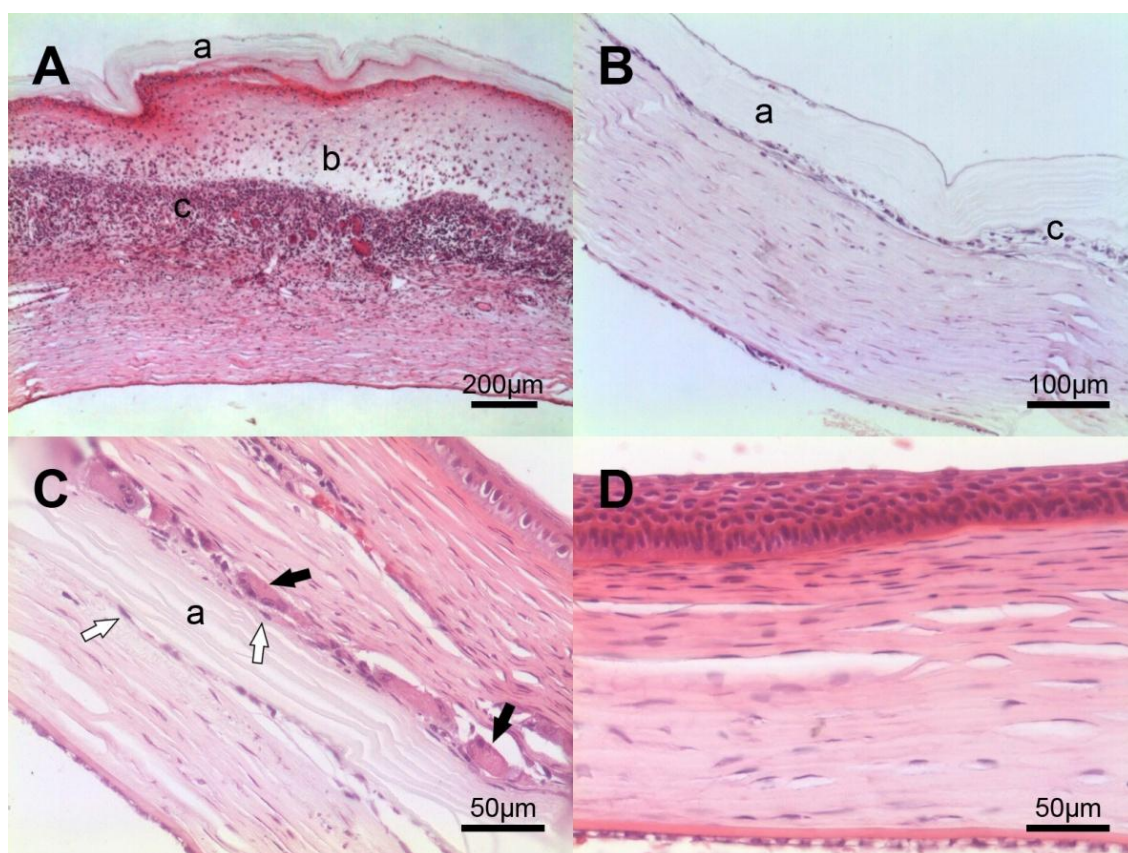


Figura 3.7. Fotomicrografias de córneas de coelhos após 45 dias da cirurgia experimental. **A** – Área central após cirurgia no animal 1 do grupo celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL), observar a presença de moderado infiltrado inflamatório e ausência do epitélio sobre o implante. **B** – Área central após implantação no animal 2 do grupo celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL), com presença de discreto infiltrado inflamatório e ausência do epitélio sobre o implante. **C** – Espaço intraestromal após cirurgia no animal do grupo celulose bacteriana (CB). **D** – Área da borda da ferida no animal do grupo controle (CT) mostrando completa epiteliação. a - Implante, b – Edema inflamatório, c - Estroma com infiltrado predominantemente linfo-histiocitário, seta preta - Células gigantes, seta branca – Fibroblastos. (coloração HE - UFV, 2012).

Enquanto hidratada (99% de água), a CB apresenta característica gelatinosa e presença de poros, o que permite a difusão de nutrientes favorecendo a biocompatibilidade (CZAJA *et al.*, 2006; KLEMM *et al.*, 2006). Depois de seca em

estufa, a membrana de CB perde seus poros, permitindo reidratação de apenas 6% na superfície (KLEMM *et al.*, 2001), podendo ser um dos motivos da redução da biocompatibilidade das membranas de CB/PCL e de CB.

Além do baixo grau de reidratação das membranas de CB/PCL e de CB, outro fator importante a ser considerado é a falta de poros em suas superfícies. No que se refere a esse aspecto, há relatos de que os primeiros biomateriais implantados na córnea culminaram com extrusão, necrose tecidual e até perfuração seguida por infecção do bulbo ocular, provavelmente pela falta de tecnologia para produzir porosidade na superfície dos biopolímeros (BARNHAM e ROPER-HALL, 1983). Trinkaus-Randal *et al.* (1991) e Wu *et al.* (1998) comprovaram que a presença de poros é fator determinante para que haja fibroplasia no interior dos implantes, melhorando sua biocompatibilidade e permitindo a integração bem sucedida do dispositivo com o tecido corneal.

Como dito anteriormente, após serem desidratadas, as membranas de CB têm suas fibras colapsadas. Esse fato resulta na perda da porosidade da membrana, impedindo a penetração de células em seu interior e dificultando a difusão de nutrientes e metabólitos, o que pode interferir na nutrição do tecido e na migração celular. Essa pode ser uma explicação para a resposta inflamatória persistente e do tipo corpo estranho encontrada nas córneas dos coelhos após implantação de membranas de CB/PCL e de CB. Isso porque o tipo de superfície dos biomateriais utilizados pode ter interferido negativamente na fisiologia local, o que fez dos implantes estruturas indesejáveis, resultando no quadro apresentado. Nesse contexto, Morales *et al.* (2005) aplicaram membranas sem poros formadas pela poliuretana de óleo de mamona na ceratoplastia lamelar e penetrante, e também no espaço intraestromal de córneas de coelhos, relatando infiltrado inflamatório mononuclear, presença de células gigantes e alto grau de extrusão que iniciou já nos primeiros cinco dias, podendo-se supor que esses resultados são consequência da falta de poros nas membranas utilizadas. Sweeney *et al.* (1998) estudaram vários tamanhos de poros em implantes intracorneais, concluindo que poros a partir de 50 nm permitem boa integração do dispositivo e nutrição das camadas anteriores da córnea. Porém, membranas contendo poros de 100 nm apresentaram os melhores resultados.

Também aos 45 dias foram observados fibroblastos aderidos aos implantes (Figura 3.7C), o que sugere afinidade celular, ou seja, um indicativo de biocompatibilidade das membranas de CB/PCL e de CB ao tecido corneal. No entanto, a ausência de poros limita a migração celular e, portanto, não há fibroplasia no interior dos implantes, o que resultaria na deposição de matriz extracelular em seu interior,

tendo como consequência a permanência prolongada dos mesmos no tecido corneal. Nesse período foi observado edema inflamatório entre o estroma e o biomaterial (Figura 3.7A), principalmente nos animais com maior grau de inflamação. Nota-se nesses animais o afastamento das membranas no sentido anterior às córneas, fato esse que pode explicar a protrusão dos implantes observada em alguns animais.

A epitelização não se completou nos grupos CB/PCL e CB após 45 dias (Figura 3.7A e B), enquanto no grupo controle o epitélio se apresentou normal ao final do acompanhamento (Figura 3.7D). Esse fato também pode ser explicado pelo baixo grau de hidratação e pela falta de poros que os implantes apresentam. Estudos mostram a importância da boa hidratação da superfície dos biomateriais e da presença de poros para a passagem de fatores de crescimento, condições que facilitam não só o crescimento do epitélio, mas também sua sobrevivência (MA *et al.*, 2011). Espana *et al.* (2011) utilizaram o pHEMA-MMA₃₄, um hidrogel com poros e conteúdo aquoso em torno de 57%, em lesões de 3.7 mm de diâmetro com dissecção profunda (ao nível da membrana de Descemet) em córneas de coelhos. Nesse estudo, a epitelização se apresentou completa ao final dos 24 meses de acompanhamento. Ma *et al.* (2011) estudaram a epitelização sobre o polimetacrilato hidrogel com a superfície modificada por aminas e revestimento da superfície com componentes da matriz extracelular, com hidratação do material em torno de 45 a 54%. Eles obtiveram completa epitelização, com revestimento de colágeno tipo IV, após cinco dias. Bentley *et al.* (2010) implantaram o composto polimérico denominado de TERP associado a copolímeros de colágeno em lesões de 4 mm de diâmetro em córneas de cães. O material apresentou superfície gelatinosa e permitiu a completa epitelização em sete dias.

Quando se compara a superfície das membranas de CB/PCL e de CB à dos biomateriais anteriormente citados, nota-se diferenças com relação à hidratação e à porosidade, reforçando a hipótese da interferência desses fatores na epitelização. Sendo assim, pode-se sugerir que as superfícies dos implantes aqui avaliados não foram aptas em permitir a adesão, o crescimento e a manutenção do epitélio corneal.

Nas amostras coradas com *Picrosirius* não foi observada nenhuma mudança na estrutura colágena aos três e aos sete dias (Figura 3.8A e B) na área da lesão, onde se encontrou maior proporção de colágeno tipo I na coloração vermelho-alaranjado e pouca proporção do colágeno tipo III que se apresenta na coloração esverdeada à luz polarizada. Esses achados estão de acordo com Michelacci (2003) e Qazi *et al.* (2010), que afirmam que na córnea o colágeno tipo I é o predominante, sendo o tipo III encontrado em pequena quantidade. Aos 21 dias foi observada maior proporção de

colágeno tipo III e desorganização das fibras colágenas em todos os grupos avaliados (Figura 3.8C e D), concordando com os resultados de Pontes (2010) que relata a predominância do colágeno tipo III aos 21 dias após a aplicação da membrana amniótica e do n-butil 2-cianoacrilato para tratar lesões penetrantes em córneas de coelhos. Fang *et al.* (2011) também relataram predominância do colágeno tipo III nas proximidades do compósito titânio/hidroxiapatita após 28 dias da implantação no espaço intraestromal de córneas de ratos. Segundo Michelacci (2003) o aumento do colágeno tipo III é um forte indicativo de que um processo cicatricial está em curso no estroma.

Aos 45 dias, nos animais implantados, ainda foi observada a predominância do colágeno tipo III e desorganização das fibras na foco da lesão (Figura 3.8E), diferindo dos resultados de Pontes (2010), que descreveu equivalência entre os dois tipos de colágeno e organização das fibras já aos 30 dias em todos os seus grupos avaliados. Já no grupo controle foi observada a equivalência entre os colágenos tipo I e III e organização das fibras na área lesionada (Figura 3.8F). Isso permite sugerir que a presença dos implantes de CB/PCL e de CB nas córneas retardaram o processo cicatricial do estroma.

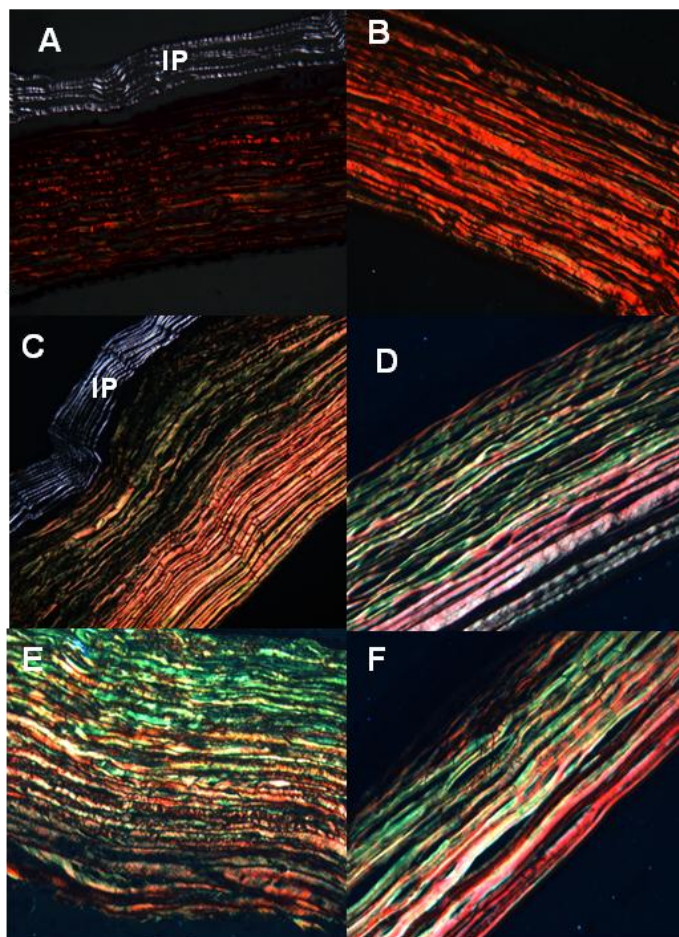


Figura 3.8. Fotomicrografia à luz polarizada da área lesionada de córneas de coelhos nos grupos celulose bacteriana/ policaprolactona (CB/PCL), celulose bacteriana (CB) e controle (CT). **A** – Grupo CB/PCL e **B** - Grupo controle sete dias após cirurgia, mostrando predominância do colágeno tipo I na coloração vermelho-alaranjado. **C** – Grupo CB/PCL 21 dias e **D** – Grupo controle 21 dias mostrando predominância do colágeno tipo III na coloração esverdeada, e também desorganização das fibras colágenas. **E** – Grupo CB 45 dias mostrando predominância do colágeno tipo III e desorganização das fibras colágenas na área lesionada, e **F** – Grupo controle 45 dias mostrando equivalência entre os colágenos tipos I e III e melhor organização das fibras colágenas. IP - Implante (coloração *Picrosirius*, 200x – UFV, 2012).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras das córneas que foram cortadas (P1), quando submetidas à MEV, demonstraram detalhes da espessura corneal como o limite entre as camadas que formam o tecido e a organização das lamelas do estroma (Figura 3.9A). Também foi possível visibilizar o posicionamento dos implantes em relação ao tecido numa vista lateral das amostras (Figura 3.9B). As estruturas da córnea, assim como o posicionamento dos implantes foram definidos pela comparação com as imagens histológicas previamente obtidas, e em imagens de MEV apresentadas por outros autores, como Espana *et al.* (2011) que demonstraram claramente a presença de implantes entre as lamelas do estroma. Após ter as camadas da córnea e os implantes identificados, foram definidas as demais estruturas, chegando-se a conclusão de que os implantes possibilitaram a deposição de matriz extracelular organizada ao longo de suas superfícies (Figura 3.9C e D), podendo ser este um sinal de integração dos implantes ao tecido. Durante as análises foram observadas estruturas ovóides, que quando comparadas aos demais componentes das amostras foram identificadas como células (Figura 3.9D).

Nas amostras fraturadas após congelamento (P2), observou-se também os diferentes planos e o posicionamento do implante em relação às camadas da córnea (Figura 3.10A), porém com mais dificuldade quando comparado ao primeiro processo (P1). Após identificação das camadas, a visualização em três dimensões apresentou-se mais nítida, possibilitando a melhor distinção das estruturas em profundidade (Figura 3.10B). As fraturas em diferentes direções permitiram observar outros segmentos do tecido e do implante, como as faces posterior (Figura 3.10B) e anterior (Figura 3.10C) da membrana implantada em relação às camadas da córnea. As células foram melhor observadas por esse método de preparação, onde no plano horizontal, estruturas filamentosas de adesão foram visualizadas partindo dos contornos ovóides e se espalhando sobre a face do implante (Figura 3.10C). Notável semelhança foi observada entre as imagens obtidas e as de Helenius *et al.* (2006) e de Chiaoprakobkij *et al.* (2011), autores que demonstram a presença de fibroblastos nas superfícies de biopolímeros. Numa fratura que preservou a espessura da córnea contendo a membrana, os contornos celulares apareceram em maior aumento, nitidamente aderidos ao implante (Figura 3.10D). No entanto não foi possível definir os tipos celulares encontrados.

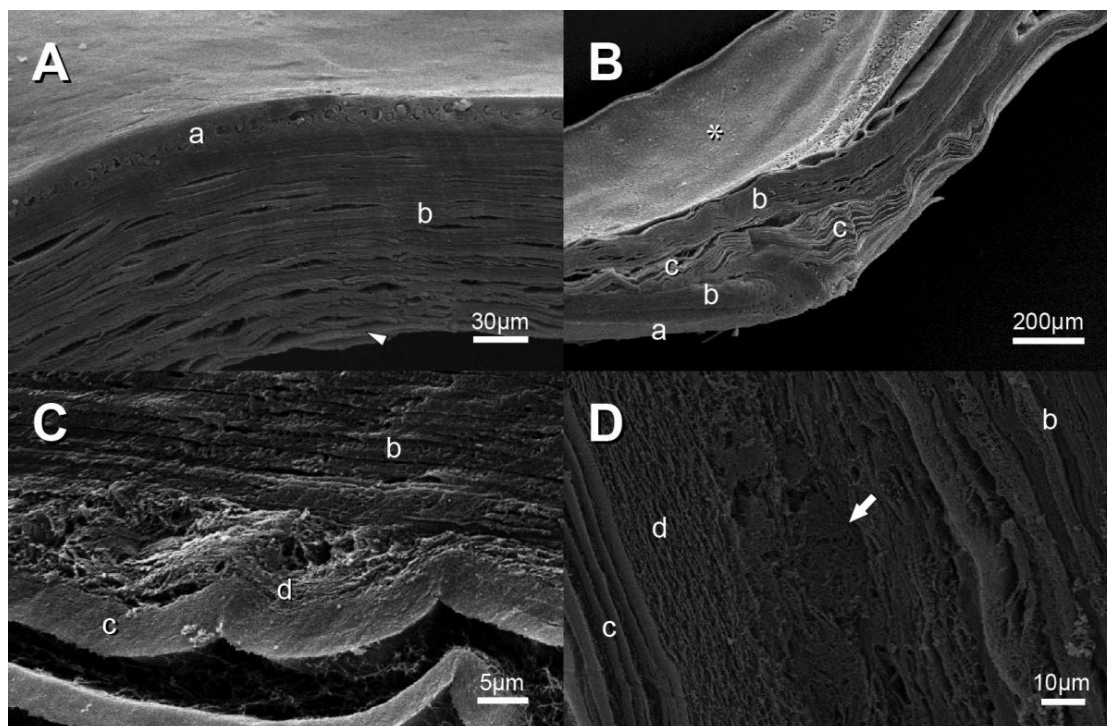


Figura 3.9. MEV das amostras de córneas de coelhos com 45 dias da implantação nos grupos celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL), celulose bacteriana (CB) e controle (CT). **A** – Grupo controle mostrando as diferentes camadas da córnea e as lamelas do estroma. **B** – Grupo CB/PCL mostrando o implante posicionado entre as camadas da córnea e matriz extracelular depositada entre o estroma e o implante. **C** – Grupo CB, mostrando em maior aumento a deposição de matriz extracelular entre o estroma e o implante. **D** – Grupo CB/PCL, mostrando deposição de matriz extracelular organizada e células entre o implante e o estroma. a - Epitélio, b – Estroma, c – Implante, d – Matriz extracelular, asterisco – Endotélio, cabeça de seta branca – Membrana de Descemet, seta branca – Células (processo P1- UFV, 2012).

Comumente a fixação do tecido corneal para se proceder a MEV é realizada com glutaldeído (PFISTER, 1975; ACOSTA, *et al.*, 2006; ESPANA *et al.*, 2011). Mesmo sendo fixadas com líquido de Bouin, as análises de MEV das amostras corneais após implantação das membranas de CB/PCL e da CB, possibilitaram nítida visualização das estruturas encontradas, revelando detalhes em maior aumento da relação tecido-implante.

É fato que os implantes tanto do composto CB/PCL quanto da CB pura atuaram de maneira protetora, funcionando como barreira física na ausência do epitélio. A visualização de matriz extracelular e de células aderidas às membranas na MEV, assim como a observação de fibroblastos nas bordas dos implantes à microscopia de luz, juntamente com a reação inflamatória moderada observada na avaliação clínica, mostram que existe relação de biocompatibilidade entre os implantes e o tecido corneal. Entretanto, observou-se nas imagens histológicas, presença de inflamação crônica e resposta tipo corpo estranho. Além disso, não houve epitelização completa da córnea nos grupos tratados.

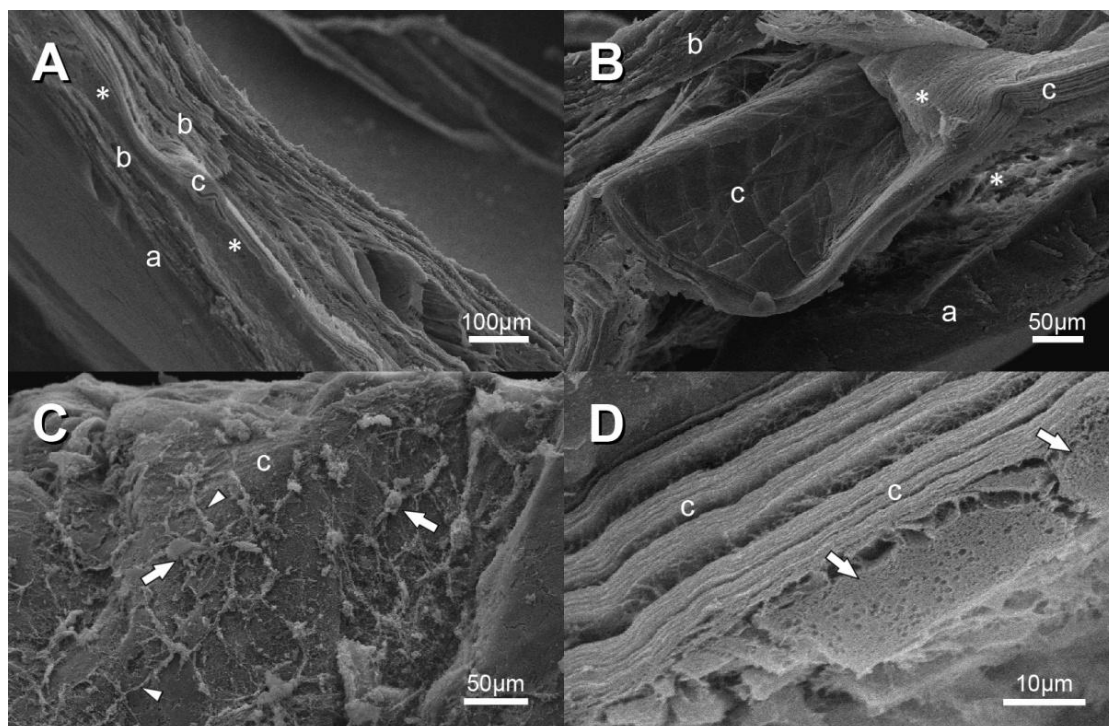


Figura 3.10. MEV das amostras de córneas de coelhos com 45 dias da implantação das membranas nos grupos celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL) e celulose bacteriana (CB). **A** – Grupo CB, mostrando o posicionamento do implante e deposição de matriz extracelular entre as camadas da córnea. **B** – Grupo CB/PCL, fratura ao longo da espessura da córnea mostrando a face posterior do implante, matriz extracelular aderida ao implante e camadas da córnea. **C** – Grupo CB, mostrando a face anterior do implante com células aderidas por meio dos seus filamentos. **D** – Grupo CB/PCL, mostrando as células aderidas ao implante. a – Epitélio, b – Estroma, c – Implante, asterisco – Matriz extracelular, cabeça de seta branca – Filamento, seta branca – Células (processo P2 - UFV, 2012).

Conclusões

Os implantes do nanocompósito celulose bacteriana/policaprolactona (CB/PCL) e da celulose bacteriana isolada (CB) protegeram a superfície ocular, permaneceram estáveis no tecido corneal após 45 dias da cirurgia e demonstraram sinais de biocompatibilidade. Entretanto, promoveram resposta inflamatória persistente e não permitiram a reepitelização sobre suas superfícies. Sendo assim, da maneira como foram desenvolvidos e fabricados, os referidos implantes não são indicados como substituto tecidual para córneas de coelhos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, à FAPEMIG, à CAPES pelo suporte financeiro e à empresa Ophthalmos, por ter fornecido todos os medicamentos e testes diagnósticos necessários para a realização do trabalho.

Referências

- ACOSTA, A.C.; ESPANA, E.M.; STOIBER, J.; LAMAR, P.D.; MARANGON, F.; ALFONSO, E.; PAREL, J.M. Corneal stroma regeneration in felines after supradescemetic keratoprosthesis implantation. **Cornea**, v. 25, n. 7, p. 830-838, 2006.
- BARNHAM, J.J.; ROPER-HALL, M.J. Keratoprosthesis: a long-term review. **British Journal of Ophthalmology**, v.67, n. 7, p. 468-474, 1983.
- BARROS, P.S.; SAFATLE, A.M.; GODOY, C.A.; SOUZA, M.S.B.; BARROS, L.F.M.; BROOKS, D.E. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 3, p. 189-92, 2005.
- BARUD, H.S.; CARONE, C.L.P.; QUEIROZ, P.V.S.; BORGES, A.P.B.; JAHNO, V.D.; LIGABUE, R.; EINLOFT, S.; RIBEIRO, S.J.L. Optically transparent membrane based on bacterial cellulose/polycaprolactone. **Polímeros – Ciência e Tecnologia**, aceito para publicação, 2012.
- BENTLEY, E.; MURPHY, C.J.; LI, F.; CARLSSON, D.J.; GRIFFITH, M. Biosynthetic corneal substitute implantation in dogs. **Cornea**, v. 29, n. 8, p. 910-916, 2010.
- BIROS D. Anterior chamber-associated immune deviation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 2, p. 309–21, 2008.
- BUSSIERES, M.; KROHNE, S.G.; STILES, J.; TOWNSEND, W.M. The use of porcine small intestinal submucosa for the repair of full-thickness corneal defects in dogs, cats and horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 5, p. 352–9, 2004.
- CHIAOPRAKOBKIJ, N.; SANCHAVANAKIT, N.; SUBBALEKHA, K.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Characterization and biocompatibility of bacterial cellulose/alginate composite sponges with human keratinocytes and gingival fibroblasts. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 548–553, 2011.
- CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR, R.M. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.
- DULING, R.R.; DUPAIX, R.B.; KATSUBE, N.; LANNUTTI, J. Mechanical characterization of electrospun polycaprolactone (PCL): a potential scaffold for tissue engineering. **Journal of Biomechanical Engineering** v. 130, n. 1, 011006, 2008.
- ELLENBERG, D.; AZAR, D.T.; HALLAK, J.A.; TOBAIGY, F.; HAN, K.Y.; JAIN, S.; ZHOU, Z.; CHANG, J.H. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, n. 3, p. 208-248, 2010.
- ESPANA, E.M.; ACOSTA, A.C.; STOIBER, J.; FERNANDEZ, V.; LAMAR, P.D.; VILLAIN, F.L.; LACOMBE, E.; ALFONSO, E.; PAREL, J.M. Long-term follow-up of a supradescemetic keratoprosthesis in rabbits: an immunofluorescence study. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**. v. 249, n. 2, p. 253–260, 2011.
- FANG, Y.D.; XIAO, M.; FEI, H.Y. Implantation of hydroxyapatite–titanium corneal implants in rat cornea. **Cornea**, v. 30, n. 1, p. 67-72, 2011.

FLECKNELL, P.A.; RICHARDSON, C.A.; POPOVIC, A. Laboratory animals. In: TRANQUILLI, W.J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K.A. (Ed). **Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia**. 4 ed., USA:Blackwell Publishing, 2007, p. 765-784.

FUCHS, J.R.; NASSERI, B.A.; VACANTI, J.P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 72, n. 2, p. 577-591, 2001.

GIMENEZ, M.T.P. e FARINA I.M. Lamellar keratoplasty for the treatment of feline corneal sequestrum. **Veterinary Ophthalmology**, v.1, n. 2-3, p. 163-5, 1998.

HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 76, n. 2, p. 431-438, 2006.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HEBLER, N.; HORNUNG, M.; SCHMAUDER, H.P.; MARSCH, S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Advances in Polymer Science**, v. 205, p. 49-96, 2006.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v.26, n.9, p.1561-1603, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, K.A.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins Patologia Básica**. 8 ed., Rio de Janeiro, Elsevier Editora Ltda, p – 33-62, 2008.

LAI, L.J.; HSIUE, G.H. Functional biomedical polymers for corneal regenerative medicine. **Reactive & Functional Polymers**, v. 67, n. 11, p. 1284-1291, 2007.

LAUS, J.L.; FERREIRA, A.L.; ANDRADE, A.L. Emprego de escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) conservada em glicerina, em ceratoplastias lamelares experimentais em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.1, p. 00, 2000.

LLOYD, A.W.; FARAGHER, R.G.A.; DENYER, S.P. Ocular biomaterials and implants. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 769-785, 2001.

MA, A.; ZHAO, B.; BENTLEY, A.J.; BRAHMA, A.; MACNEIL, S.; MARTIN, F.L.; RIMMER, S.; FULLWOOD, N.J. Corneal epithelialisation on surface-modified hydrogel implants artificial cornea. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 3, p. 663-670, 2011.

MACEDO, L.R.; RIBEIRO, A.P.; CONCEIÇÃO, L.F.; GALERA, P.D.; LAUS, J.L. Experimental lamellar keratoplasty in rabbits using microfibrillar cellulose membrane. Clinical, morphological and immunohistochemical findings. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.378-383, 2010.

MICHELACCI, Y.M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 8, p. 1037-1046, 2003.

MORALES, A.; BARROS, P.S.M.; BARNIERI NETO, J.; CHIERICE, G.; CLARO NETO, S.; MIGLIATI, E.R. Experimental use of a castor bean (*Ricinus communis* L.) oil derived polymer on lamellar, interlamellar and penetrating implants in rabbit's

- cornea. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.1, p. 31-37, 2005.
- PFISTER, R.R. The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit: a scanning electron microscope study. **Investigative Ophthalmology**, v. 14, n. 9, p. 648-66, 1975.
- POK, S.W.; WALLACE, K.N.; MADIHALLY, S.V. In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 1061–1068, 2010.
- PONTES, K.C.S. **Membrana amniótica xenógena, associada ou não ao n-butil 2-cianoacrilato, no tratamento de lesão corneal perfurada. Estudo experimental em coelhos**. 2010. Tese (doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Viçosa-MG, Brasil, p. 76.
- PONTES, K.C.S.; BORGES, A.P.B.; ELEOTÉRIO, R.B.; REIS, E.C.C.; DUARTE, T.S. Preserved xenogenic amniotic membrane as a patch on the repair of superficial corneal ulcers in rabbits. **Ceres**, v. 59, n.3, p. 313-320, 2012.
- PRESSLER, B.M. Transplantation in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 3, p. 495–505, 2010.
- QAZI, Y.; WONGA, G.; MONSONA, B.; STRINGHAMB, J.; AMBATIA, B.K. Corneal transparency: Genesis, maintenance and dysfunction. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 2, p. 198–210, 2010.
- SHEARDOWN, H. e GRIFFITH, M. Regenerative Medicine in the Cornea. In; ATALA, A. LANZA, L. THOMSON, J. NEREM, R. **Principles of Regenerative Medicine**, 3 ed., Elsevier, p. 1060-1071, 2008.
- SLATTER, D. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3 ed. São Paulo, Rocca Ltda, p. 283-310, 2005.
- SUN, H.; MEI, L.; SONG, C.; CUI, X.; WANG, P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 1735–1740, 2006.
- SWEENEY, F.D; XIE, R.Z.; O'LEARY, D.J.; VANNAS, A.; ODELL, R.; SCHINDHELM, K.; CHENG, H.Y.; STEELE, J.G.; HOLDEN, B.A. Nutritional Requirements of the Corneal Epithelium and Anterior Stroma: Clinical Findings. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 39, n. 2, p. 284-291, 1998.
- TANURE, M.A.G. O uso de biomateriais na córnea. In: ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais; Fundamentos e Aplicações**. Cultura Médica, p. 385-391, Rio de Janeiro, 2006.
- TOWNSEND, W.M.; RANKIN, A.J.; STILES J.; KROHNE. S.G. Heterologous penetrating keratoplasty for treatment of a corneal sequestrum in a cat. **Veterinary Ophthalmology**, v. 11, n. 14, p. 273–278, 2008.
- TRINKAUS-RANDALL, V.; BONWATT, R.; COPECCHI, J.; LEIBOWITZ, H.M.; FRANZBLAU, C. In vivo fibroplasia of a porous polymer in the cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, n. 13, p. 3245-51, 1991.
- TRINKAUS-RANDALL, V.; NUGENT, M.A. Biological response to a synthetic cornea. **Journal of Controlled Release**, v. 53, n. 1-3, p. 205–214, 1998.

WIPPERMANN, J.; SCHUMANN, D.; KLEMM, D.; KOSMEHL, H.; SALEHI-GELANI, S.; WAHLERS, T. Preliminary Results of Small Arterial Substitute Performed with a New Cylindrical Biomaterial Composed of Bacterial Cellulose. **European Journal of Vascular & Endovascular Surgery**, v. 37, n. 5, p. 592-596, 2009.

WU, X.Y.; TSUK, A.; LEIBOWITZ, H.M.; RANDALL, V.T. In vivo comparison of three different porous materials intended for use in a keratoprosthesis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 82, n. 5, p. 569–576, 1998.

YADAV, V.; PANILIATIS, B.J.; SHI, H.; LEE, K.; CEBE, P.; KAPLAN, D.L. Novel In Vivo-Degradable Cellulose-Chitin Copolymer from Metabolically Engineered *Gluconacetobacter xylinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6257–6265, 2010.

CAPITULO IV

Considerações finais e perspectivas

O tecido corneal apresenta características físicas especiais tais como viscoelasticidade e transparência, que são conferidas por seus componentes estruturais e seu modelo fisiológico, que envolve o rigoroso controle hídrico e a ausência de vasos no tecido. No entanto, a ausência de vasos faz com que a regeneração tecidual após lesões seja lenta, o que pode predispor à complicações, razão pela qual, em caso de lesões progressivas, se faz necessária a intervenção cirúrgica. Nesse contexto, os biomateriais vêm sendo utilizados como substitutos do tecido corneal, dando proteção às estruturas internas do bulbo ocular e recuperando o estado refrativo da córnea.

O biomaterial para ser aplicado na córnea, além de ser biocompatível, deve possuir boa elasticidade, alta transparência no centro óptico e sua superfície deve permitir o crescimento e manutenção do epitélio. Não é aconselhável o uso de materiais degradáveis, pois o tecido corneal regenerado com o auxílio destes não tem demonstrado características ópticas e mecânicas de uma córnea saudável.

A celulose bacteriana (CB) é um polímero biocompatível que forma membranas maleáveis e não é degradável nos tecidos animais, características favoráveis para aplicação na córnea. No entanto, sua elasticidade e transparência são limitadas. A adição de policaprolactona (PCL) à membrana de CB resultou no composto CB/PCL que apresentou membranas mais elásticas e mais transparentes, tornando o material mais adequado para a implantação na córnea. Porém, as superfícies das membranas se mostraram lisas, sem poros e com baixo grau de reidratação.

As membranas de CB/PCL e de CB após serem implantadas nas córneas demonstraram biocompatibilidade, pois foi observado na avaliação clínica resposta inflamatória moderada que regrediu ao longo do tempo. Houve também adesão de células e de matriz extracelular na superfície das membranas demonstradas pela MEV e pela histologia. No entanto, os implantes com as características que demonstraram, não foram capazes de mimetizar o tecido corneal. Prova disso é o infiltrado inflamatório persistente e as células gigantes observados na histopatologia das córneas implantadas, juntamente com o fato de não haver completa epitelização sobre as membranas.

Contudo, não se deve deixar de pesquisar os biopolímeros aqui estudados em aplicações na córnea, pois há maneiras diferentes de processá-los, e essas podem dar

origem a características diferentes. Como exemplo, as membranas de CB poderiam ser utilizadas no seu estado úmido ou parcialmente desidratadas, já que alguns trabalhos demonstraram bons resultados após aplicação do material nessas condições em outros tecidos. A CB também pode ter sua superfície modificada, como na secagem por liofilização que resulta em um material com poros e reidratação de até 70%, o que poderia contribuir para a adesão celular e melhor aceitação do tecido. Outra modificação possível, seria no peso molecular da PCL (2000 u) utilizada neste estudo, que é considerado baixo. Polímeros com peso molecular mais elevados tendem a apresentar melhor compatibilidade com os tecidos. Assim, poderia ser testado o mesmo compósito, porém com peso molecular mais alto. Dessa forma, acredita-se que este é apenas o início dos estudos com a CB e a com PCL na produção de dispositivos para serem aplicados na córnea.